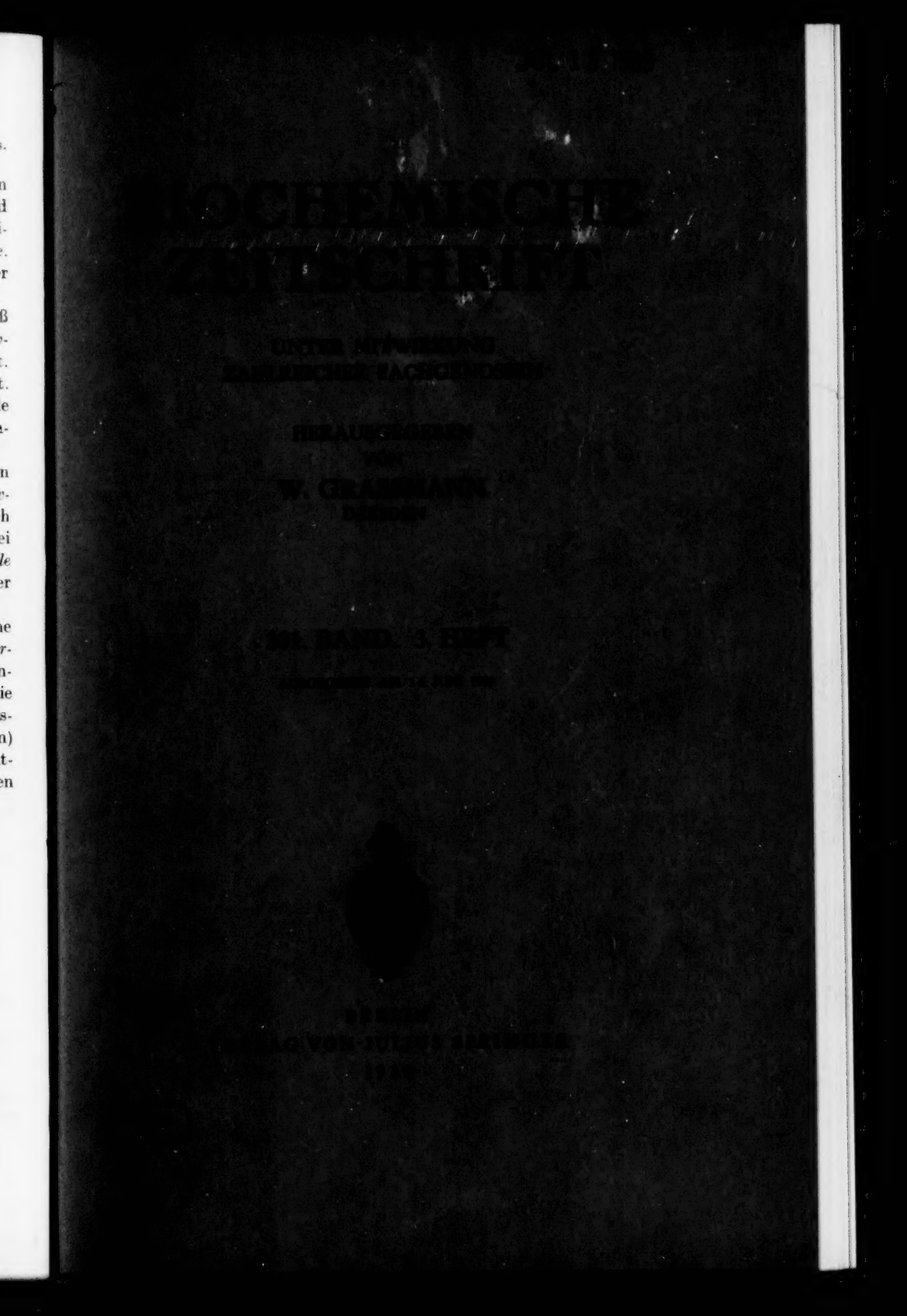


Die [illegible]

erscheint zwanglos in Heften, [illegible] Band.
Der Preis des Bandes beträgt RM [illegible]

In der Regel [illegible]

Manuskriptsendungen [illegible]

Herrn Prof. Dr. F. [illegible]

zu richten.

Bei Arbeiten aus [illegible]

Die Autoren erhalten [illegible]

Der Autor erhält [illegible]

Es wird [illegible]

Die Mitarbeiter erhalten [illegible]

[illegible] Springer

301. Band [illegible] 3. Heft

Seite

Fink, Hermann und Jos. Krebs. [illegible] VII. Mitteilung: [illegible] 137

Fink, H., J. Krebs und R. Lechner. [illegible] maximalen Hefeernten [illegible] 148

Skarżyński, Bolesław. [illegible] 150

Lechner, Richard. Über die [illegible] synthese. IV. Mitteilung: [illegible] mischungen 170

Ohlmeyer, Paul. [illegible] Gärung 189

Theorell, Hugo. Über die [illegible] Darstellung von Porphyrin-Cyt[illegible] 201

Sreenivasan, A. Veränderungen [illegible] während der Lagerung 210

Heubner, Wolfgang und [illegible] für Blausäure 219

Kurze Mitteilungen.

Warburg, Otto und Walter [illegible] Fermente der Gärung 221

Pinkusch, E. und O. A. [illegible] 223

Beiträge zur biologischen Zellsubstanz-Synthese der Hefe.

VII. Mitteilung:

Diskussion der bei den Standardversuchen erhaltenen Hefeausbeuten.

Von

Hermann Fink und **Jos. Krebs.**

(Aus dem Institut für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 2. März 1939.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz der in Tabelle I und II unserer I. Mitteilung[1] angeführten Versuche wurden effektiv erreicht, geben aber noch keinerlei Anhaltspunkte darüber, wieviel Hefetrockensubstanz theoretisch aus Zucker erhalten werden kann, oder, was das gleiche bedeutet, welche Zuckermenge allein nur zum Aufbau von neuer Hefezellsubstanz diente. Die endgültige Lösung dieses Problems setzt vielmehr voraus, den chemischen Verlauf der Stoffwechselvorgänge beim Hefewachstum wenigstens summarisch zu kennen.

H. Claassen[2] stellte nun erstmals eine Formel auf, nach welcher es möglich sein soll, die Hefeausbeuten zu errechnen. Nach seinen letzten Angaben lautet diese Formel:

$$\text{Höchsternte } \% = \frac{100 - 2 \times \text{Alkohol}}{2{,}14 \times \text{Eiweiß} + 2{,}22 \times \text{N-frei}} \cdot 100.$$

Hierbei bedeuten: „Alkohol" die aus 100 g Zucker erhaltene Alkoholmenge in g, „Eiweiß" den Gehalt der Erntehefe an Eiweiß in % und „N-frei" den Gehalt der Erntehefe an stickstofffreien Stoffen in %. Auf die Ableitung dieser Formel wurde bereits früher eingegangen. Wie *Claassen* erwähnt, „kann diese Formel bei verständiger Anwendung eine recht wertvolle Betriebskontrolle bilden", ist also in erster Linie für eine überschlägige Errechnung der Ausbeute in der Praxis der Hefefabrikation gedacht.

Schon bei näherer Überlegung aber zeigt sich, daß es unzulässig ist, aus der Zusammensetzung der Erntehefe allein die Ausbeute bestimmen zu wollen, da hierbei die Zusammensetzung der Aussaathefe völlig unberücksichtigt bleibt, es sei denn die Stellhefegabe derartig gering,

[1] *Fink* u. *Krebs*, diese Zeitschr. **299**, 1, 1938. — [2] Siehe Literaturzusammenstellung in der I. Mitteilung, diese Zeitschr. **299**, 26, 27, 1938.

oder von der gleichen Zusammensetzung wie die Erntehefe. Da dies jedoch im allgemeinen nicht zutrifft, kann nicht die Zusammensetzung der Erntehefe, sondern nur der Zuwachs an Eiweiß bzw. stickstofffreien Stoffen für die Ausbeuteberechnung herangezogen werden. Desgleichen ist es unzulässig, in der Formel den für die Alkoholbildung benötigten Zucker (= 2 × Alkohol) in den Zähler des Bruches zu setzen und von der Hefetrockensubstanz abzuziehen, wie es *Claassen* in seinen letzten diesbezüglichen Mitteilungen getan hat. Er ist vielmehr im Nenner zum Zuckerbedarf für Eiweißstoffe und N-freie Stoffe zu addieren.

Der *Claassen*schen Ausbeuteberechnung sind die Annahmen *J. Effronts*, daß der Aufbau der Eiweißstoffe der Hefe über Acetaldehyd führt, und zwar derart, daß zur Bildung von einem Teil Eiweißstoffe 2 Teile Zucker erforderlich sind und die Annahme *K. Bernhauers*, daß für den Aufbau von einem Teil der stickstofffreien Stoffe ebenfalls 2 Teile Zucker erforderlich sind und hierbei je 1 Molekül Zucker 3 Moleküle Kohlendioxyd gebildet werden, zugrunde gelegt.

Nach dem Verhältnis der aus 100 g Zucker erhaltenen Kohlensäurewerte zu den Erträgen an organischen Stoffen der Hefe und an Alkohol erscheint jedoch die Vermutung berechtigt, daß der Aufbau der stickstofffreien Bestandteile der Hefe nach den Bruttogleichungen:

$$3\,C_6H_{12}O_6 + 3\,O_2 \rightarrow 6\,CH_3 \cdot CHO + 6\,CO_2 + 6\,H_2O \qquad (I)$$

$$6\,CH_3 \cdot CHO + 3\,O_2 \rightarrow 2\,C_6H_{12}O_6 \qquad (II)$$

$$2\,C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\,(C_6H_{10}O_5) + 2\,H_2O \qquad (III)$$

erfolgt; es würden in diesem Falle für einen Teil stickstofffreier Stoffe 1,667, rund 1,67 Teile Zucker nötig sein.

Die für den Hefezuwachs erforderliche Zuckermenge berechnet sich demnach wie folgt:

$$\text{g Zucker} = (\text{g Eiweißzuwachs} + \text{g ausgeschiedenes Eiweiß}) \times 2{,}00 + \text{g stickstofffreie Stoffe} \times 1{,}67.$$

Die Formel für die (theoretische) Höchstausbeute würde also lauten:

$$\text{Hefeausbeute } \% = \frac{100 \times \text{Zuwachs an Hefetrockensubstanz}}{(\text{g Eiweiß} + \text{g ausg. Eiw.}) \times 2{,}0 + \text{g N-frei} \times 1{,}67}.$$

Hierin bedeuten: „Eiweiß" den Eiweißzuwachs, „ausg. Eiweiß" die gesamte von der Hefe wieder ausgeschiedene Eiweißmenge, das ist organischer Stickstoff der vergorenen Nährlösung × 6,25, und „N-frei" den Zuwachs an asche- und stickstofffreien Stoffen.

In der Tabelle I sind zunächst nochmals die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz der bisherigen Versuche zusammengestellt und unter den verschiedensten Gesichtspunkten betrachtet. Es sind angeführt:

In Spalte 1 die Nummer des Versuchs.

„ „ 2 die aus 100 g verbrauchter Glucose erhaltene Ausbeute an Hefetrockensubstanz in %:

$$\frac{\text{g Hefetrockensubstanz} \times 100}{\text{g verbrauchte Glucose}}.$$

„ „ 3 die auf 100 g verbrauchte Glucose, abzüglich der für die Bildung des Alkohols erforderlichen Zuckermenge, bezogene Hefeausbeute in %:

$$\frac{\text{g Hefetrockensubstanz} \times 100}{\text{g verbrauchte Glucose} - 1{,}96 \times \text{Alkohol}}.$$

„ „ 4 die aus der Zusammensetzung der Erntehefe nach *Claassen* errechnete praktische Höchstausbeute:

$$\frac{(100 - 2 \times \text{Alkohol}) \times 100}{2 \times (1 + \% \text{ ausgeschiedenes Eiweiß}) \times \text{Eiweißgehalt} + 2{,}22 \times \text{Gehalt an N-freien Stoffen}}.$$

„ „ 5 die aus der Zusammensetzung der Erntehefe nach *Claassen* errechnete theoretische Höchstausbeute:

$$\frac{100 \times 100}{2 \times \text{Eiweißgehalt} + 2{,}22 \times \text{Gehalt an N-freien Stoffen}}.$$

„ „ 6 die erhaltene Ausbeute an Hefetrockensubstanz, bezogen auf 100 g verbrauchten Zucker, abzüglich der für den gebildeten Alkohol erforderlichen und der zu der überschüssigen Kohlensäure verbrannten Zuckermenge:

$$\frac{\text{g Hefetrockensubstanz-Zuwachs} \times 100}{\text{g verbrauchte Glucose} - [(1{,}96 \times \text{g Alkohol}) + (1{,}02 \times \text{g überschüssige } CO_2)]}.$$

Dieser letzten Berechnung wurde also die Annahme zugrunde gelegt, daß der gesamte Zucker zunächst nach der *Gay-Lussac*schen Alkoholgleichung abgebaut wird und so die gleiche Kohlensäuremenge ergibt wie bei einer alkoholischen Gärung. Ein Teil dieser Zwischenprodukte bzw. Nebenprodukte wird jedoch zu Kohlensäure und Wasser verbrannt und geht somit für den Aufbau von Hefekörpersubstanz verloren.

In Spalte 7 der Tabelle wurde die aus dem Zuwachs an Eiweiß und stickstofffreien Stoffen sowie dem gebildeten Alkohol errechnete, theoretisch erforderliche Zuckermenge angeführt:
Zucker = (g Eiweißzuwachs + g ausgeschiedenes Eiweiß) × 2,00 + g N-freie Stoffe × 1,67 g + g Alkohol × 1,96 g.

„ „ 8 die aus dem Zuwachs an eiweiß- und stickstofffreien Stoffen sich errechnende praktisch bestmögliche Ausbeute an Hefe unter Berücksichtigung des gebildeten Alkohols, sowie des wieder ausgeschiedenen Eiweißes.

$$\frac{\text{Zuwachs an Hefetrockensubstanz} \times 100}{(\text{g Eiweißzuwachs} + \text{g ausgeschiedenes Eiweiß}) \times 2{,}00 + \text{g asche- und N-freie Stoffe} \times 1{,}67 + \text{g Alkohol} \times 1{,}96}.$$

In Spalte 9 die aus dem Zuwachs an Eiweiß und an stickstofffreien Stoffen sich errechnenden theoretischen Höchstausbeuten an Hefetrockensubstanz:

$$\frac{\text{Zuwachs an Hefetrockensubstanz} \times 100}{2{,}00 \times \text{g Eiweißzuwachs} + 1{,}67 \times \text{g asche- u. N-freien Zuwachs}}$$

„ „ 10 die in Spalte 7 errechnete Zuckermenge in % der angewandten Zuckermenge.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Versuch Nr.	Zuwachs an Hefetrockensubstanz je 100 g Glucose g	Zuwachs an Hefetrockensubstanz je 100 g (Glucose — 1,96 × Alkohol) g	Nach *Claassens* Formel errechnete praktische Ausbeute aus 100 g Glucose g	Nach *Claassens* Formel errechnete theoretische Höchstausbeute je 100 g Glucose g	Zuwachs an Hefetrockensubstanz je 100 g Glucose abzüglich der aus Alkohol und der überschüssigen CO_2 errechneten Glucose g	Aus dem Zuwachs errechnete notwendige Glucosemenge g	Errechnete praktische Ausbeute an Hefetrockensubstanz aus 100 g Glucose g	Errechnete theoretische Höchstausbeute an Hefetrockensubstanz aus 100 g Glucose g	Berechneter Zucker in % der angewandten Zuckermenge (Zuckerausnutzungsgrad) %
1	33,10	44,10	38,20	51,80	—	305,77	39,85	57,70	87,3
2	47,45	49,00	49,40	51,55	—	126,59	55,20	58,00	90,3
3	41,20	51,00	—	—	—	—	—	—	—
4	48,00	51,95	—	—	—	—	—	—	—
5	50,75	52,45	50,50	52,90	—	66,73	56,00	59,00	90,5
6	49,80	51,10	50,50	52,30	—	65,14	56,40	58,50	88,5
7	52,10	52,70	51,30	52,50	—	67,04	57,20	59,30	91,1
8	52,10	53,70	50,50	52,50	—	64,70	56,30	59,45	92,5
9	50,15	51,35	51,00	52,60	53,90	62,08	56,50	59,20	88,8
10	52,30	53,20	50,90	52,50	57,90	67,95	56,80	58,70	92,2
11	50,70	51,60	52,00	52,90	56,70	65,57	57,00	58,50	89,1
12	47,85	52,50	47,80	53,10	58,07	63,87	52,40	58,90	91,1
13	50,07	50,80	52,10	53,10	53,45	61,55	56,90	58,30	88,0
14	49,05	49,20	52,10	52,90	53,45	60,03	57,20	58,10	85,8
15	51,35	51,60	52,00	52,60	56,40	62,64	57,40	58,20	89,5
16	51,75	51,75	51,90	52,50	57,10	63,19	57,35	58,20	90,3
17	52,45	52,45	52,20	53,00	55,00	32,09	57,20	58,30	91,7
18	51,05	51,05	52,45	52,90	55,30	30,94	57,80	58,50	88,5
19	49,70	50,00	50,95	52,00	53,40	30,42	57,00	58,30	87,2
22	49,40	54,30	48,00	53,30	56,50	66,19	52,80	59,00	93,7
23	53,50	54,50	51,60	53,00	—	69,28	57,30	59,00	93,6
24	27,08	51,00	26,86	52,00	—	66,14	28,65	57,80	94,5
25	36,01	53,30	35,08	53,00	—	66,60	37,90	58,30	95,2
26	50,44	51,00	46,60	52,60	56,10	62,25	56,75	58,50	89,0
27	49,50	49,60	51,20	52,20	55,30	60,63	57,10	58,45	86,8
28	50,70	50,80	51,50	52,30	57,80	61,97	57,30	58,20	88,5
29	51,95	52,20	52,50	53,50	58,60	62,93	57,80	58,95	90,0
30	50,50	50,50	52,60	52,90	57,95	60,01	59,00	59,00	85,8
31	51,50	51,60	52,70	53,40	57,50	62,55	57,50	58,45	89,4
32	49,85	49,85	52,50	53,25	56,30	60,66	57,50	58,50	86,7
Mittelwert:	48,38	51,34	49,18	52,68	56,14	—	54,43	58,55	89,8

Zur Errechnung der in Spalte 4, 7 und 8 angeführten Werte wurde nur für die Versuche 22, 23, 24 und 25 der von der Hefe wieder ausgeschiedene Stickstoff zu 1,5 % des von ihr umgesetzten Stickstoffs angenommen.

Beim Vergleich der in Spalte 2 und 4 angeführten Werte läßt sich feststellen, daß bei 11 Versuchen die tatsächlich erhaltenen Ausbeuten an Hefetrockensubstanz aus 100 g Zucker höher liegen, als die nach der Formel von *Claassen* errechneten Werte für die praktisch höchstmöglichen Ausbeuten. Die auf 100 g (Zucker $- 1{,}96 \times$ Alkohol) bezogenen Ausbeuten (Spalte 3) unterscheiden sich zum Teil nur wenig von den nach der *Claassen*schen Formel unter den günstigsten Bedingungen, daß sämtlicher angewandter Zucker in Hefezellsubstanz übergeführt wird, errechneten und somit, nach *Claassen*, theoretischen Höchstausbeuten (Spalte 5). Bei 5 Versuchen werden letztere sogar überschritten. Es ist aber kaum anzunehmen, daß theoretische Höchstausbeuten in der Praxis, auch bei den Laboratoriumsversuchen, wirklich erreicht werden. Die theoretische Ausbeute muß also höher liegen, als sich nach den *Claassen*schen Angaben errechnen läßt.

Es wurden nun aus dem Zuwachs an Eiweiß und an stickstofffreien Stoffen der Standardversuche die praktischen und theoretischen Höchstausbeuten errechnet, und zwar unter Zugrundelegung der Annahme, daß zur Bildung von einem Teil stickstofffreier Stoffe nur 1,67 Teile Zucker erforderlich sind. Neben der theoretischen Ausbeute an Hefe würde nur eine der *Gay-Lussac*schen Gleichung entsprechende Kohlensäuremenge entstehen. Die so errechneten Ausbeuten sind in Spalte 8 und 9 angeführt; sie liegen durchweg über den tatsächlich erhaltenen Werten und betragen im Mittel 54,4 und 58,5%.

Wie bereits in einer früheren Mitteilung erwähnt, ist die erhaltene Kohlensäuremenge höher als die aus der gleichen Zuckermenge nach der Alkoholgleichung errechnete, und zwar nimmt sie mit fallender Hefeausbeute zu. Für die Annahme, daß dies auf direkte Verbrennung von Zucker bzw. dessen Abbauprodukten zurückzuführen ist, muß also, um die Höchstausbeute zu errechnen, die der „überschüssigen" Kohlensäure nach der Atmungsgleichung entsprechende Zuckermenge, gleich der zur Alkoholbildung benötigten Zuckermenge, von der Gesamtmenge abgezogen werden, da sie dann nicht zum Aufbau neuer Hefezellsubstanz verwertet wurde. Auch diese Berechnung wurde mit den Versuchsergebnissen durchgeführt und die Resultate in Spalte 6 aufgezeichnet. Die so erhaltenen Ausbeuten an Hefetrockensubstanz liegen immer noch unter den errechneten theoretischen Werten, kommen diesen aber schon ziemlich nahe. Die noch verbleibende Differenz könnte in der Bildung geringer Mengen von Nebenprodukten ihre Ursache haben.

Von den Versuchen 23, 24 und 25 konnte eine derartige Berechnung nicht durchgeführt werden, da die Kohlensäuremenge niedriger ist als die nach der Alkoholgleichung errechnete. Wie bereits erwähnt, kann dies darauf zurückzuführen sein, daß noch Abbauprodukte des Zuckers vorhanden sind, welche normalerweise von der Hefe unter Abspaltung von Kohlendioxyd weiter verwertet werden. Eine unter dieser Betrachtung durchgeführte Berechnung ergibt bei Versuch 23 unter Berücksichtigung

der gefundenen Brenztraubensäure einen den übrigen Resultaten entsprechenden Wert von 56,20. Nur die beiden mit Trockeneigelbauszügen durchgeführten Versuche fallen mit 68,70 und 58,90 aus.

Für eine einfache Betriebskontrolle zur überschlägigen Errechnung der Hefeausbeute sind die angestellten Berechnungen allerdings nicht gedacht. Den, wie in Spalte 7, aus dem Zuwachs an Eiweiß und stickstofffreien Stoffen errechneten Zucker zu der angewandten Zuckermenge in Beziehung zu setzen, wäre jedoch ein gangbarer Weg um festzustellen, wieweit der Zucker allein zur Bildung von Hefezellsubstanz ausgenutzt wird.

Ein Beispiel, durchgeführt an den Ergebnissen des Versuchs 10, möge zur näheren Erläuterung dienen:

Angewandt wurden 70,00 g Saccharose, 73,70 g Glucose entsprechend. Der Zuwachs an Eiweiß beträgt 21,28 g und an stickstofffreien Stoffen 13,87 g. Die hierfür theoretisch erforderliche Zuckermenge ist demnach: $21{,}28 \times 2{,}00 + 13{,}87 \times 1{,}67 = 65{,}73$ g, d. s. 89,2% der angewandten Zuckermenge. Der Ausnutzungsgrad des Zuckers bei der Hefezüchtung beträgt demnach 89,2%.

Im Anschluß an dieses Rechenbeispiel sollten nun im folgenden noch die oben abgeleiteten Formeln auf Fälle angewandt werden, bei denen die Abhängigkeit der theoretischen Hefeausbeute von den Erträgen an Eiweiß gezeigt wird. Bei einer achtfach angenommenen Hefevermehrung und einem Höchstgehalt von 8% Asche in Aussaat- und Erntehefe errechnet sich das Verhältnis theoretische Hefeausbeute zur theoretischen Eiweißausbeute, wie aus Tabelle II und Kurve ersichtlich ist:

Tabelle II. Die Abhängigkeit der „theoretischen" Hefeausbeute von den Erträgen an Eiweiß. (Theoretisch berechnet.)

Die Hefevermehrung wurde 1 : 8, der Aschegehalt von Aussaathefe und Erntehefe mit 8% angenommen.

Theoretische Eiweißausbeute	Theoretische Hefeausbeute	Theoretische Eiweißausbeute	Theoretische Hefeausbeute	Theoretische Eiweißausbeute	Theoretische Hefeausbeute
40,67	56,35	27,48	59,19	12,91	62,30
37,50	57,03	23,97	59,90	9,02	63,10
34,20	57,72	20,38	60,66	5,42	64,00
30,89	58,41	16,69	61,50		

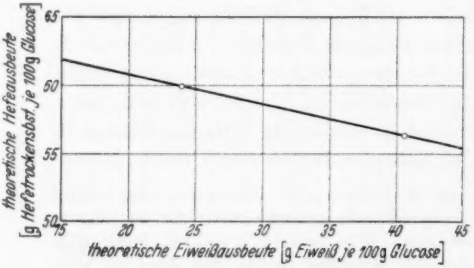


Abb. 1.

Diesen Berechnungen wurden Annahmen zugrunde gelegt, die streng zu beweisen noch weitere Aufgabe sein wird. Die endgültige Lösung des Problems, welche Hefeausbeuten maximal aus Zucker erreicht werden können, wird aber erst dann möglich sein, wenn auch der Gang des Chemismus der Stoffwechselvorgänge bei Hefewachstum und Vermehrung einwandfrei bekannt ist. Hierüber wird in der folgenden Mitteilung verhandelt werden.

Zur Theorie der Zellsubstanz-Synthese und der maximalen Hefeernten.

Von

H. Fink, J. Krebs und R. Lechner.

(Aus dem Institut für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 17. Juni 1938.)

In unseren letzten Veröffentlichungen[1] haben wir über die *praktisch möglichen* Hefeernten aus Zucker und anorganischen Nährsalzen berichtet, die wir bei der gemeinsam mit *Krebs* ausgearbeiteten Standardhefezüchtungsmethode erhalten haben. Durch Anwendung intensiver Belüftung und geeigneter Nährstoffzufuhr konnte bei der Wuchshefe Torula utilis der biochemische Vorgang so gesteuert werden, daß die Hefevermehrung als biologische Stoffsynthese als Hauptreaktion ganz vorherrscht und die Vergärung des Zuckers zu Alkohol zu einer unscheinbaren Nebenreaktion wird. Das Ergebnis, das wir bei den mit eingehenden Stoffbilanzen durchgeführten Versuchen erzielt hatten, ist in folgendem Übersichtsschema seinerzeit[2] versinnbildlicht worden.

Gärung auf Alkohol.

Gleichung: $C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$.

Theor. Ausbeute: 100,0 g Traubenzucker → 51,1 g Alkohol + 48,9 g Kohlensäure.

Prakt. Ausbeute: 5 bis 15% niedriger.

Theor. Energieausbeute: $\frac{364{,}9}{374{,}3} = 97{,}5\,\%$.

Prakt. Energieausbeute: 93 bis 86%.

„Gärung" auf Hefezellsubstanz.

(Biologische Eiweißsynthese.)

Gleichung: noch unbekannt.

Theor. Ausbeute: (noch unbekannt) 236 g Hefe.

Bisherige prakt. Höchstausbeute nach *Fink, Lechner* und *Krebs*: 100 g Traubenzucker + Nährsalze geben 210 g Hefe (25% Trockensubstanz mit 59,4% Eiweiß) + 53,5 g Kohlensäure + 0,02 g Alkohol.

Theor. Energieausbeute: (noch unbekannt) etwa 73%.

Prakt. Energieausbeute: 63 bis 67% nach *Fink*.

---

[1] Diese Zeitschr. **290**, 135 u. 447, 1937; **296**, 306, 1938; **299**, 1, 1938; **299**, 28, 1938; ferner „Vorratspflege und Lebensmittelforschung" **1**, 56; **2**, 119, 1938. — [2] *H. Fink*, Angew. Chem. **51**, 475, 1938.

Inzwischen sind unsere Arbeiten so weit fortgeschritten, daß wir auf Grund verschiedener neu gefundener Beziehungen weitgehende Aussagen über die *theoretisch mögliche Höchsternte an Hefezellsubstanz* und damit auch über die *theoretische Energieausbeute* machen können.

Gleich an dieser Stelle sei erwähnt, daß wir unter der theoretisch möglichen Höchsternte den Grenzwert verstehen, den die Bildung neuer Zellsubstanz, bezogen auf die Glucoseeinheit, im Idealfalle erreichen kann. Dieser Grenzwert wird praktisch aber ebenso wenig ganz erreicht, wie die theoretisch mögliche Ausbeute an Alkohol nach der *Gay-Lussac*schen Gärungsgleichung, die ebenfalls einen Grenzwert darstellt.

Die Werte für die theoretisch mögliche Höchstausbeute an Hefe liegen danach (vgl. Übersicht S. 143) bei etwa 236 g Hefe mit 25 %[1] Trockensubstanz von 55 bis 60 % Rohprotein pro 100 g Traubenzucker. Die nicht unbeträchtliche Streuung von etwa 228 bis 240 g Hefe liegt, wie gleich noch ausgeführt werden soll, in der Natur der Sache.

Die theoretische Energieausbeute liegt somit bei etwa 73 %.

Diese Zahlen sagen ebenso wie die auf Trockensubstanz umgerechneten Werte von 57 bis 60 g Hefetrockensubstanz in theoretischer Hinsicht noch nicht viel aus.

Wir sehen daraus zwar beim Vergleich mit unseren Werten für die im praktischen Versuch tatsächlich erzielten Höchstausbeuten (210 g Hefe), daß wir im Mittel bis auf etwa 90 % an die Theorie herangekommen sind, also etwa ebenso weit, wie man bei der alkoholischen Gärung von reinen Zuckerlösungen im praktischen Versuch an die sich aus der *Gay-Lussac*schen Gärungsgleichung errechenbaren Werte herankommt.

Es ist dies zunächst ein experimentell recht befriedigendes Ergebnis, wenn man bedenkt, wie viel komplizierter ein standardisierter Modellzüchtungsversuch mit „Zulauf" der Nährstoffe, mit Zuführung der jeweils angepaßten Luftmenge in möglichst feiner Verteilung, mit Regulierung des p_H usw. durchzuführen ist, ganz abgesehen von der bilanzmäßigen Erfassung der einzelnen Stoffkomponenten in Ausgangs- und Erntehefe, Nährflüssigkeit, in den Gärgasen und deren Waschwässern.

In theoretischer Hinsicht aber ergeben sich die wichtigen Beziehungen erst, wenn wir einerseits den C-Gehalt der theoretischen Hefeausbeute und die Ausbeute an Kohlensäure bzw. deren C-Gehalt bei unserer Betrachtung heranziehen. Nach unseren derzeitigen Vorstellungen ergibt sich nämlich vom Standpunkt der Zucker- bzw. C-Ausnutzung für den Idealfall, daß der C-Gehalt der theoretisch möglichen Ernte an Hefezellsubstanz zwei Drittel des im eingesetzten Zucker enthaltenen Kohlenstoffs entsprechen muß und daß ein Drittel des Zucker-Kohlenstoffs als Kohlensäure auftritt. Dies würde bedeuten, wenn wir zu den obigen Gleichungen zurückkehren wollen, daß von

[1] Der Einfachheit halber als mittlerer Durchschnittswert angenommen.

40,0 g C, die in 100 g Zucker stecken, maximal 26,7 g C in entsprechend zusammengesetzte Hefezellsubstanz eingebaut werden und 13,3 g C als CO_2 in Erscheinung treten.

Wir kommen also zunächst für einen *speziellen* Fall zu folgender Beziehung:

100 g Glykose + Nährsalze[1] + Sauerstoff ergeben
→ 236 g Hefe (25 % Trockensubstanz, 11,31 % C) + 48,9 g CO_2 oder
→ 59 g Hefetrockensubstanz mit 45,3 % C + 48,9 g CO_2.

Bei diesem Ausdruck ist eine spezielle Hefe bestimmter Zusammensetzung aus einem unserer Versuche willkürlich zugrunde gelegt worden. Der Gehalt an den einzelnen Stoffgruppen wie Rohprotein, N-freie Extraktstoffe und Asche in der trockenen Zellsubstanz kann natürlich, wenn wir Hefen aus verschiedenen Züchtungsversuchen heranziehen, innerhalb der üblichen Grenzen schwanken und damit auch, dem unterschiedlichen C-Gehalt dieser Stoffgruppen entsprechend, der Zahlenwert für die Ausbeute an Hefetrockensubstanz. *Der Gesamtkohlenstoffgehalt, der in die Zellsubstanz eingebaut ist, muß dagegen 26,7 g sein.*

Allgemein können wir deshalb, wie oben schon angedeutet, in bezug auf die Kohlenstoffbilanz schreiben:

40,0 g C, enthalten in 100 g Glykose + Nährsalze + Sauerstoff, ergeben
→ 26,7 g C, eingebaut in die Hefezellsubstanz jeweiliger Zusammensetzung + 13,3 g C, enthalten in 48,9 g CO_2.

Wenn wir auch noch nicht in der Lage sind, für die „Gärung" auf Hefezellsubstanz eine molare „Bruttogleichung" im Sinne der *Gay-Lussac*schen Gärungsgleichung zu schreiben, so möge doch folgende Vorstellung den Kernpunkt unserer Auffassung auch über die Zellsubstanzbildung, wenigstens im Hinblick auf die Kohlenstoffbilanz, wiedergeben:

Es können im Idealfalle bei Torula utilis, wenn man alle Bedingungen möglichst auf maximales Hefewachstum einstellt, von den sechs Kohlenstoffatomen im Glucosemolekül vier Kohlenstoffatome zum Aufbau neuer Hefezellsubstanz herangezogen werden, während dann zwei Kohlenstoffatome als CO_2 in Erscheinung treten. Wie oben erwähnt, ist die Menge Hefetrockensubstanz, die maximal aus den vier Kohlenstoffatomen entstehen könnte, innerhalb gewisser, nicht allzu weiter Grenzen von der jeweiligen zum Teil durch die Züchtungsbedingungen bedingten Zusammensetzung abhängig. Es wirkt sich hier aus: Der Aschegehalt der Hefe, aber auch das Mengenverhältnis an Rohprotein, Kohlenhydraten, Lipoiden und sonstigen C-haltigen Stoffen, da bekanntlich die einzelnen Stoffklassen verschieden hohen Kohlenstoffgehalt haben. Unter Zugrundelegung des obigen Zahlenbei-

[1] Enthaltend alle nötigen Zellbausteine; sie müssen kohlenstofffrei sein, damit die C-Bilanz stimmt oder, wenn Carbonate vorhanden, muß der C-Gehalt berücksichtigt werden.

spiels aus unseren Versuchen würden sich aus den vier Grammatomen Kohlenstoff, entsprechend 48 g C, 425,0 g geerntete Hefe von 25 % Trockensubstanz oder 106,1 g Hefetrockensubstanz ergeben.

Diese fast verblüffend einfache Beziehung ist unter der Vielzahl von mehr oder weniger spekulativen Hypothesen über den Grenzwert, den die Hefeernte aus Zucker im Idealfalle erreichen kann, bisher merkwürdigerweise am allerwenigsten diskutiert worden. *Effront* erwähnt sie zuerst einmal, wie aus einem Bericht über einen Vortrag, den er 1926 vor belgischen Gärungsleuten gehalten hatte, zu entnehmen ist. Daß er aber diese Hypothese selbst für nicht wahrscheinlich hält, geht wohl klar daraus hervor, daß er in seiner 1927 an prominenterer Stelle, nämlich in den Comptes rendus, veröffentlichten Arbeit sie nicht mehr erwähnt hat, sondern ganz andere Gedankengänge vertritt und theoretische Höchstausbeuten von über 70 g Hefetrockensubstanz auf 100 g Zucker angibt.

Durch unsere sehr eingehenden und zahlreichen Versuche halten wir nun die oben entwickelte, so einfache summarische Beziehung über die theoretisch mögliche Hefeernte aus Zucker für bewiesen. Es ist aus der als Spekulation gelegentlich erwogenen Hypothese eine weitgehend fundierte Gesetzmäßigkeit geworden.

Voraussetzung für diese Auffassung ist natürlich, daß außer der Hefezellsubstanzbildung alle Nebenreaktionen zum Stillstand kommen. Dieselbe Annahme macht man aber auch stillschweigend bekanntlich bei der *Gay-Lussac*schen Gärungsgleichung, wenn man die theoretische Ausbeute an Alkohol und Kohlensäure berechnet, denn, wie *Fink* und *Lechner*[1] in letzter Zeit nachgewiesen haben, wird diese praktisch nur zu etwa 88 % erreicht, da auch hier durch Nebenreaktionen Stoff und Energie verbraucht wird. Auf die Nebenreaktionen, die bei der Hefezellsubstanzbildung eine Rolle spielen und die verursachen, daß auch hier die theoretischen Werte nur bis zu etwa 90 % erreicht werden, soll in späteren Veröffentlichungen nochmals eingegangen werden.

Während unsere bisherigen Auffassungen sich summarisch mit der Stoffbilanz, speziell mit der Kohlenstoffbilanz bei der Zellsubstanzbildung befaßten, soll nun noch auf *die energetische und reaktionsmechanistische Seite* eingegangen werden. Unsere Annahme, daß bei der Zellsubstanzneubildung der Hefe ebensoviel Kohlensäure entsteht wie bei der alkoholischen Gärung nach der *Gay-Lussac*schen Formelgleichung, legt die Frage nahe, auf welche Weise dann die für den Zellaufbau notwendige Energie verfügbar wird[2]. Es würde ja im Idealfalle nach unserer

[1] Diese Zeitschr. **283**, 71, 1935. — [2] Bekanntlich gipfeln alle bisherigen Theorien darin, daß ein beträchtlicher Teil des Zuckers zwecks Energiebeschaffung direkt veratmet wird.

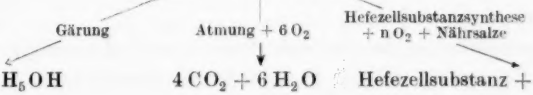
Auffassung nur „Spaltungskohlensäure" und keinerlei „Atmungskohlensäure" entstehen, von der bekanntlich auf ein verbrauchtes Zuckermolekül dreimal soviel Kohlensäure mit etwa 40fachem Energiegewinn (als bei der alkoholischen Gärung) anfallen müßte. Dies führt zu der Schlußfolgerung, daß im Idealfalle die gesamte Energie für den Aufbau neuer Zellsubstanz aus der Verbrennung des Wasserstoffs von den Dehydrierungsvorgängen stammen müßte, bei denen letzten Endes Sauerstoff als Acceptor auftritt. Wenn nun nur Spaltungskohlensäure entstehen soll, müssen wir also für die erste Phase bei der Zellsubstanzsynthese aus Zucker — die hier ganz summarisch zunächst ohne Eingehen auf die Spezialsynthese von Kohlenhydrat, Eiweiß und Fett betrachtet werden soll — den gleichen Vorgang annehmen wie bei der alkoholischen Gärung und vielleicht auch bei der Atmung. Dieser führt zunächst bis zu jener Stufe, bei der aus Brenztraubensäure Kohlensäure abgespalten wird, nämlich bis zur Bildung von Acetaldehyd und Wasserstoff. Er ist gemeinsam anzunehmen für die drei Hauptstoffwechselfunktionen Gärung, Atmung und Zellsubstanzsynthese[1]. Erst dann gehen die Wege verschieden weiter.

Im einfachsten oder, richtiger gesagt, im best bekannten Falle, der alkoholischen Gärung, zum Endprodukt Alkohol durch Hydrierung des Acetaldehyds mittels der 4 H-Atome, im Falle der totalen Veratmung mit molekularem Sauerstoff zu den Endprodukten CO_2 und H_2O, und endlich im Falle der Hefezellsubstanzbildung in Gegenwart der nötigen Zellbausteine und gleichzeitiger Gegenwart von Sauerstoff zum Aufbau der verschiedenartig zusammengesetzten Hefezellsubstanz aus Acetaldehyd und verfügbarem Wasserstoff. Diese drei Möglichkeiten sollen durch folgendes Schema erläutert werden.

I. Phase (Einleitende Zuckerspaltung)

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow \underbrace{2\,CH_3C\lessgtr^{O}_{H} + 4\,H + 2\,CO_2}$$

II. Phase



Es erhebt sich nun die Frage, über welches *erste Intermediärprodukt* die Zellsubstanzsynthese beim maximalen aeroben Hefewachstum verläuft.

[1] Der eine von uns (*H. Fink*) hat für den Ausdruck biologische Zellsubstanzsyntbese unlängst den Ausdruck „Verhefung" vorgeschlagen.

Aus der Annahme, daß nur 2 Mol Spaltungskohlensäure aus dem Zuckermolekül entstehen, ergibt sich im weiteren Verfolg dieser Auffassung, daß die Spaltung des Zuckers bis zu den C_2-Verbindungen geführt haben muß. Von diesen aus kann nun der Aufbau der Zellsubstanz oder, genauer gesagt, die Synthese der einzelnen organischen Zellbestandteile beginnen.

Nach unseren experimentellen Befunden[1] kommen in Frage: Acetaldehyd, Alkohol und Essigsäure. Am naheliegendsten erscheint die Annahme, daß der Acetaldehyd als Ausgangsstoff, gewissermaßen als *Wendepunkt zwischen Spaltung und Aufbau* bzw. Wiederaufbau in Frage kommt. Die dann noch verfügbaren vier Wasserstoffatome können dann mit Sauerstoff als Acceptor zu Wasser verbrannt werden und mit der Energiebeschaffung dienen.

Als Ausgangsverbindung für den Aufbau könnte man, was unwahrscheinlicher ist, aber auch den Alkohol in Betracht ziehen. Das Unterschiedliche gegenüber der ersten Annahme ist dann, daß der Acetaldehyd von den 4 H-Atomen noch vorher reduziert worden ist und in einer weiteren Phase wieder dehydriert werden kann.

Essigsäure kommt nicht als „Wendepunkt", sondern eher als nächste Stufe des Aufbauweges hinter dem Acetaldehyd in Frage, was durchaus im Sinne der verschiedentlich vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen (*Bernhauer*, *Nord* u. a.) liegt.

Da alle drei C_2-Verbindungen nach unseren Versuchen[2] mit Torula utilis als vollwertige C- und Energiequellen statt Zucker zum Zellaufbau verwertet werden können und damit als Zwischenprodukte in Frage kommen, ist zur Zeit eine ganz sichere Entscheidung noch nicht zu treffen. Vielleicht lassen sich aus der Höhe der Ausbeute an Hefetrockensubstanz und Kohlensäure aus den genannten Verbindungen Rückschlüsse ziehen, besonders dann, wenn man auch hier wieder die energetische Betrachtungsweise zu Rate zieht. Leider wird bei den Züchtungsversuchen mit Acetaldehyd die genaue Bilanzierung wegen der schwierigen Erfassung des flüchtigen Anteils des Acetaldehyds erschwert. Eine weitere Klärung und Entscheidung hoffen wir hier durch Abfangversuche herbeizuführen, die auch schon die ersten Erfolge gezeitigt haben.

Die Voraussetzung, aus der sich diese neuen Auffassungen ergaben, waren die Ergebnisse unserer Standardzüchtungsmethode, bei der in reproduzierbarer Weise bisher unerreichte Hefeernten aus reinen, einheitlichen Nährsubstraten erzielt werden konnten, die nach allem den theoretisch möglichen Ausbeutewerten naheliegen mußten. Nachdem somit dieses Gebiet der praktisch höchstmöglichen Hefeernten gewissermaßen erschlossen war, ergaben sich bald wichtige neue Beziehungen,

[1] Vorratspflege und Lebensmittelforschung **1**, 56, 119, 1938. — [2] A. a. O.

die nicht nur für dieses Gebiet selbst Geltung hatten, sondern auch zwingende Schlüsse auf die theoretisch mögliche Hefeernte erlaubten. So war eine der stärksten Stützen für diese neuen Auffassungen die mit *Krebs* wiederholt gemachte Beobachtung, daß mit steigender Hefeausbeute die Menge der anfallenden Kohlensäure geringer wurde und sich mehr und mehr der Kohlensäuremenge näherte, die bei der alkoholischen Gärung der gleichen Zuckermenge entsprochen hätte.

Wie erwähnt, konnten wir bisher im *praktischen Züchtungsversuch* etwa bis zu 90% an den Grenzwert der theoretischen Höchsternte herankommen. Ebenso entstand stets mehr Kohlensäure, z. B. in obigem Beispiel (S. 143) auf 100 g Glucose bezogen, 53,5 g statt des theoretischen Wertes von 48,9 g. Der Überschuß an Kohlensäure von 4,6 g würde dann aus direkter Veratmung von Zucker stammen. Der anteilige Betrag an veratmetem Zucker wäre somit verhältnismäßig recht klein, der anteilige Betrag an so gewonnener Energie jedoch trotzdem verhältnismäßig hoch. Praktisch scheint es nach unseren Versuchen so zu sein, daß bei noch so ökonomisch geführter Hefezüchtung eine bestimmte kleine Quote an direkter Zuckerveratmung bestehen bleiben muß, sei es nun als gekoppelte Nebenreaktion, die zusätzliche Energie liefern kann, oder sei es als induzierender Vorgang.

Diese Vorstellung über den Reaktionsmechanismus hat sich als Arbeitshypothese in den letzten Jahren gut bewährt und findet in unseren bisherigen Experimenten eine starke Stütze. Trotzdem haben wir eine diametral gegenüberstehende, nach unseren Versuchsergebnissen aber weniger wahrscheinliche Hypothese für den Reaktionsmechanismus der biologischen Zellsubstanzsynthese stets im Auge behalten. Nach dieser wird von uns angenommen, daß die im Idealfalle entstehenden 48,9 g CO_2 nur Atmungskohlensäure seien. Es müßte dann ein Drittel der Glucose restlos veratmet werden und zwei Drittel der Glucose so in Zellsubstanz umgewandelt werden, daß dabei überhaupt keine Kohlensäure mehr entsteht. Der Wendepunkt für den Aufbau bzw. Umbau zu Kohlenhydraten und Eiweißstoffen und anderen Inhaltsstoffen müßte dann teils bei den C_3-Körpern (Brenztraubensäure, Milchsäure usw.) liegen oder es müßte dieser durch Kondensation von C_6-Körpern zu polymeren Kohlenhydraten erfolgen.

Die Möglichkeit einer Überlagerung beider antagonistisch gegenüberstehender Auffassungen soll nur erwähnt werden.

Welche Erklärung sich auch immer als endgültig erweisen wird, wichtiger sind die Tatsachen, daß über die praktisch mögliche Höchsternte aus Zucker und über die theoretisch mögliche Höchsternte Klarheit besteht.

Ob die oben entwickelten Auffassungen über die biologische Zellsubstanzsynthese nur für die Hefe Torula utilis, die „Stammutter der Hefen" gelten, oder ob sie allgemeinere biologische Bedeutung haben, wird von uns geprüft werden.

Spektrographische Untersuchungen von Flavonfarbstoffen.

Von

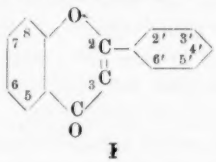
Bolesław Skarżyński.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Jagiell. Universität Kraków.)

(Eingegangen am 3. März 1939.)

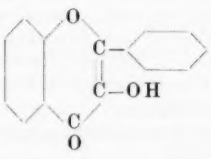
Mit 16 Abbildungen im Text.

Stanisław Kostanecki und seine Mitarbeiter haben in den Jahren von 1897 bis 1901 den Beweis erbracht, daß eine Reihe von weit in der Natur verbreiteten Farbstoffen (Chrysin, Apigenin, Quercetin) von einem gemeinsamen Gerüst, nämlich dem 2-Phenyl-γ-benzopyron (von *Kostanecki Flavon* benannt) (I) abstammen.

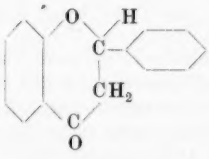


I

Die erwähnten natürlichen Farbstoffe haben sich als Hydroxyderivate des Flavons herausgestellt. Die Mehrzahl stammt von dem 3-Oxy-flavon, dem *Flavonol* (II), ab. Verhältnismäßig selten wurden die Abkömmlinge des Dihydroflavons — *Flavanons* (III) — angetroffen.



II



III

Die Arbeiten von *Kostanecki* wurden in den Laboratorien von *A. G. Perkin*, *R. Robinson* und von den japanischen Forschern *K. Shibata* und *S. Hattori* weitergeführt. Es ergab sich eine überraschende Mannigfaltigkeit der natürlichen Flavonfarbstoffe und manche bisher unbekannte Quellen dieser Farbstoffe im Pflanzenreich[1] wurden dabei entdeckt.

---

[1] *F. Czapek*, Biochemie der Pflanzen, 3. Aufl., **1925**, III, S. 402–427; *E. Bergmann*, Ergebn. d. Physiol. **35**, 182ff., 1933; *Rupe-Schaerer*, Handb. d. Pflanzenanalyse III, 901ff.

Trotz vieler gründlicher chemischer Arbeiten über die Flavonfarbstoffe erhielten unsere Kenntnisse von der Beteiligung dieser Verbindungen an den Lebensprozessen der Pflanzen erst in den letzten Jahren eine experimentelle Grundlage. Die Schule von *A. Szent-Györgyi* vertritt den Standpunkt, daß die Flavonfarbstoffe die Rolle eines Zwischengliedes in dem pflanzlichen Enzymsystem: Ascorbinsäure-Ascorbinsäure-oxydase-o-Dioxy-flavon-Peroxydase[1] spielen.

Noch weniger sicher ist die Bedeutung der Flavonverbindungen für die Lebensprozesse im tierischen Organismus. Die Untersuchungen von *F. Fukuda*[2], *A. Jeney*[3], *T. Valgi-Nagy* zeigten eine deutliche pharmakologische Wirkung mancher Flavonderivate. *A. Szent-Györgyi*[4] und Mitarbeiter nehmen an, daß die Flavonglykoside Eriodictyol und Hesperetin im tierischen Organismus die Rolle eines antihämorrhagischen Vitamins, *Vitamin P* (Citrin) spielen. Diese Befunde sind jedoch durch *S. S. Zilva*[4] und *Th. Moll* und *W. Küssner*[5] bestritten worden.

Das Problem des Vitamins P und die Bedeutung der Flavone für den tierischen Organismus sind noch nicht geklärt. Gleichgültig, ob die Existenz des Vitamins P sich bestätigen lassen wird, muß damit gerechnet werden, daß die in der Natur weitverbreiteten und oft in der tierischen Nahrung vorhandenen Flavonfarbstoffe für den Organismus nicht belanglos sein dürften.

Die Hauptschwierigkeit bei der Erforschung des Schicksals der Flavonverbindungen im Pflanzen- und Tiergewebe bildet der Mangel an empfindlichen und spezifischen Reaktionen. Die Reaktionen, über welche die chemische Methodik zur Zeit verfügt, gelten nur für einige Gruppen von Flavonverbindungen. Da sie nicht von der Struktur des Flavonmoleküls im ganzen, sondern von speziellen Atomgruppierungen abhängen, können sie nicht als spezifische Reaktionen für den Nachweis eines gesuchten Flavons angesehen werden. Sogar das Identifizieren der im reinen Zustande isolierten Flavone stößt öfters auf große Schwierigkeiten, denn oft kristallisieren diese Verbindungen schwer, ihre Schmelzpunkte liegen hoch und sind unscharf. Angesichts dieser Schwierigkeiten haben bereits im Jahre 1922 die japanischen Forscher das Absorptionsspektrum der Flavone mit der Absicht untersucht, eine spezifische Nachweismethode für diese Substanzen zu finden. *Y. Shibata*, *K. Kimotsuki*, *T. Tasaki* und *S. Hattori*[6] befaßten sich mit dem Studium

[1] *A. Szent-Györgyi*, Acta med. Szeged. **9**, 72, 1937; *St. Huszak*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **247**, 239, 1937. — [2] *F. Fukuda*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **164**, 865, 1932. — [3] *A. Jeney* u. *A. Czimmer*, ebenda **183**, 571, 1937. — [4] *S. Rusznyak* u. *A. Szent-Györgyi*, Nature **138**, 27, 1936; *A. Bentiath*, *S. Rusznyak* u. *A. Szent-Györgyi*, ebenda **138**, 798, 1936; **139**, 326, 1937. — [5] *Th. Moll* u. *W. Küssner*, Mercks Jahresber. **51**, 58, 1938. — [6] *Y. Shibata* u. *K. Kimotsuki*, Acta phytochimica, Tokyo **1**, 91, 1922; *T. Tasaki*, ebenda **2**, 119, 129, 1924; *S. Hattori*, ebenda **4**, 41, 63, 1928; **5**, 219, 1931; **6**, 131, 1932.

des ultravioletten Absorptionsspektrums einer Reihe von Flavonverbindungen. Sie machten viele wertvolle Beobachtungen, welche sie zur Aufklärung der damals noch mangelhaft erforschten Struktur der Flavone zu verwerten versuchten. Die genannten Forscher arbeiteten jedoch mit der veralteten *Hartley*schen Methode, welche schon öfters wegen ihrer Mängel Anlaß zu Meinungsverschiedenheiten gab. Außerdem arbeiteten die japanischen Forscher meistens mit den natürlichen Flavonverbindungen, was den Kreis ihrer Untersuchungen beträchtlich einschränkte. Die Arbeiten von *S. Lajos* und *M. Gerendas*[1], sowie von *R. Grinbaumówna* und *L. Marchlewski*[2] führten bei Untersuchung des Absorptionsspektrums einiger Flavone zu anderen Ergebnissen als die japanischen Forscher angeben. Das Gebiet muß daher noch einmal durchgearbeitet werden.

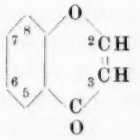
Zu meinen Versuchen über die Absorptionsspektren der Flavonderivate benutzte ich eine Serie von meist synthetischen Flavonpräparaten, die sich im Institut für organische Chemie der Jagiellonischen Universität als Nachlaß von Prof. *S. Kostanecki* befinden. Ich beabsichtigte damit die wichtigsten Typen der Flavonverbindungen zu charakterisieren. Eine Zusammenstellung solcher Absorptionsspektren dürfte eine Identifizierung der einzelnen Flavone ermöglichen oder sie wenigstens näher charakterisieren, in vielen Fällen sogar dann, wenn sie sich in einer Mischung mit anderen Körpern befinden. Das charakteristische Absorptionsspektrum der Flavone, welches auch in sehr großer Verdünnung sichtbar ist, könnte eine Grundlage zur quantitativen Bestimmung dieser Verbindungen liefern. Ein systematisches Register der Spektren dieser Reihe von Homologen kann auch einen wertvollen Beitrag zu dem noch immer nicht erschöpften Problem des Zusammenhanges zwischen Spektrum und chemischer Struktur bringen.

Die Grundeigenschaft des Ultraviolett-Absorptionsspektrums der Flavone ist die selektive Verstärkung der Absorption in zwei Spektralabschnitten, von denen der eine im Bereiche der längeren und der andere im Bereiche der kurzen Wellen liegt. In Abhängigkeit von der Struktur der einzelnen Verbindungen ändern die Absorptionsbereiche ihre Lage und es ändert sich auch die Entfernung zwischen den beiden Absorptionsbanden. Auch die Intensität der Lichtabsorption, der Extinktionsgrad, ist abhängig von der Molekülstruktur. In einzelnen Fällen unterscheidet man im langwelligen Abschnitt des Spektrums zwei Absorptionsbanden, ausnahmsweise kann man dasselbe im kurzwelligen Teile des Spektrums beobachten. In anderen Fällen sinkt die Absorption des Lichtes im langwelligen Teile merklich ab und die

[1] *S. Lajos* u. *M. Gerendas*, diese Zeitschr. **291**, 299, 1937. — [2] *R. Grinbaumówna* u. *L. Marchlewski*, ebenda **290**, 261, 1937.

Absorptionskurve zeichnet sich in diesem Abschnitt nur durch einen Knick aus und nicht durch ein voll ausgebildetes Absorptionsband. Man kann jedoch in jedem Falle eine Erhöhung des Extinktionsgrades in zwei Abschnitten des Ultraviolett-Spektrums finden.

Dieser charakteristische Verlauf des Absorptionsspektrums der Flavone ist für die Struktur des *γ-Benzopyrons* oder *Chromons* bezeichnend.



Leider hatte ich kein freies Chromon zur Verfügung, sondern nur Präparate von einigen Oxy- und Methoxy-Homologen. Die Spektren dieser Verbindungen zeigen deutlich die Merkmale der Flavonspektren (Abb. 1). Im kurzwelligen Gebiete des Spektrums charakterisieren sich manche Methoxychromone durch zwei schmale, niedrige Absorptionsbanden, aber auch in diesen Fällen sind die charakteristischen Züge der Flavonspektren deutlich erkennbar. Unzutreffend ist also die Meinung von *Shibata* und *Kimotsuki*[1], welche den Grund für die selektive Absorption in dem kurzwelligen Gebiete des Spektrums in der Phenylgruppe des Flavongerüstes sehen, denn, wie man aus obigem entnehmen kann, ist das Band im kurzwelligen Teile für die Chromonstruktur charakteristisch.

Der Kürze halber werde ich das Absorptionsband im langwelligen Teile des Spektrums als *Band I*, das Band im kurzwelligen Teile als *Absorptionsband II* bezeichnen.

Die Einführung des Benzylrestes in die Stellung 2 des Chromons ändert den Charakter des Spektrums nicht wesentlich, 7-Methoxy-2-benzyl-chromon, welches ein Homologes des 7-Methoxy-flavons ist, unterscheidet sich vom betreffenden Methoxychromon nur durch eine kleine Verschiebung des Bandes I in der Richtung gegen die kürzeren Wellen hin. Andererseits modifiziert die direkte Einführung des Phenylrestes in die Stellung 2 des 7-Methoxychromons das Spektrum merklich. Das Band I verschiebt sich in der Richtung gegen die längeren Wellen, das Band II verliert seine zwei getrennten Maxima und die Extinktion nimmt wesentlich zu. Das Spektrum wird für Methoxyflavone charakteristisch.

Das Spektrum des Flavons wird durch zwei Absorptionsbanden bei 2975 und 2500 Å charakterisiert. Hydrierung der Doppelbindung im Pyronkern führt das Flavon in Flavanon über. Diesem Übergange

[1] *Shibata* u. *Kimotsuki*, Acta phytochimica **1**, 95, 1922.

folgt eine Änderung des Absorptionsspektrums (Abb. 2 und 3). Die Extinktion sinkt deutlich ab und das Band I verschiebt sich in der Richtung zu langen Wellen. Die Absorptionsmaxima befinden sich bei 3200 und 2520 Å.

Die Einführung der OH-Gruppe in den Flavonkern verändert fast immer das Spektrum, wobei diese Veränderung sich besonders in der Lage des Bandes I kennzeichnet. Die OH-Gruppe in der Stellung 6 des Benzopyronringes ruft eine deutliche Verschiebung des Bandes I ins Langwellige hervor und dazu eine bedeutende Verschiebung des Bandes II (von 2500 auf 2720 Å) (Abb. 3, 2). Auch das Spektrum des 7-Oxyflavons ist durch die Verschiebung des Bandes I in Richtung zu längeren Wellen (von 2975 auf 3050 Å) (Abb. 3, 3) gekennzeichnet.

Die OH-Gruppe in der Stellung 2′ oder 3′ ändert das Flavonspektrum nicht beträchtlich. Im Spektrum des 3′-Oxy-flavons bemerkt man nur eine Verschiebung des Bandes II in Richtung zu kürzeren Wellen hin. Aus den gemessenen Spektren der Poly-oxy-flavone geht hervor, daß die Einführung der OH-Gruppe in die Stellung 3′ in manchen Fällen einen hyperchromen Einfluß auf das Band I ausübt und ohne seine Lage zu ändern die Extinktion verstärkt. Ähnlich muß man annehmen, daß die OH-Gruppe in der Stellung 2′ keinen beträchtlichen Einfluß und den nur in manchen Fällen auf das Spektralbild ausübt, wobei dieser Einfluß sich durch die Verschiebung des Bandes I ins Langwellige kennzeichnet (5, 7-Dioxy- und 5, 7, 2′-Trioxy-flavonol; 5, 7, 4′-Trioxy- und 5, 7, 2′, 4′-Tetraoxy-flavonol) (Abb. 11, 1 und 13, 4, 13, 2 und 14, 2).

Die Lage des Bandes I ändert sich jedoch gründlich durch die Einführung der OH-Gruppe in die Stellung 4′ (Abb. 3, 5). In diesem Falle verschiebt sich das Band I merklich in Richtung zu längeren Wellen, und dieser bathochrome Effekt läßt sich bei allen 4′-Oxy-Homologen des Flavons wiederfinden. Zugleich wird das Band II des Spektrums des 4′-Oxy-flavons niedriger und zeichnet sich in der Absorptionskurve nur als ein Knick bei 2550 Å aus. Eine ähnliche Änderung der Absorption der kurzen Wellen kann man beim 4′-Oxy-flavonol beobachten (Abb. 5, 1).

Eine noch deutlichere Umgestaltung erfährt das Flavonspektrum beim Einführen der OH-Gruppe in Stellung 3. Im Falle des 3-Oxyflavons, d. h. also beim Flavonol, tritt nicht nur eine bedeutende Verschiebung des Bandes I in Richtung zu längeren Wellen (von 2975 auf 3475 Å), sondern es tritt noch ein drittes, nicht besonders hohes, jedoch sehr deutliches Absorptionsband bei 3050 Å hervor (Abb. 2, 2). Diesen Typus zeigen mit kleinen Modifikationen alle Homologen des Flavonols, in denen die OH-Gruppe bei C_3 frei ist, was noch ausführlicher im Zusammenhang mit dem Flavonolspektrum besprochen werden soll.

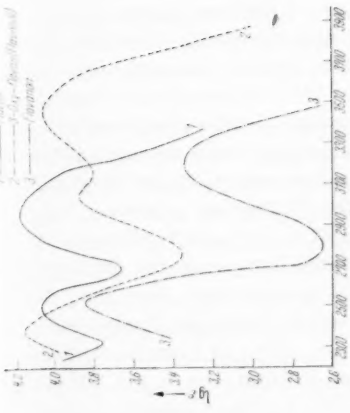


Abb. 2.

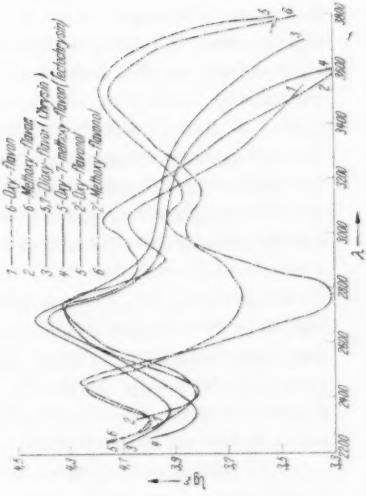


Abb. 4.

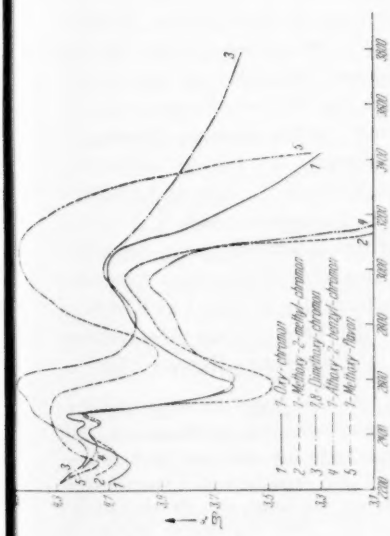


Abb. 1.

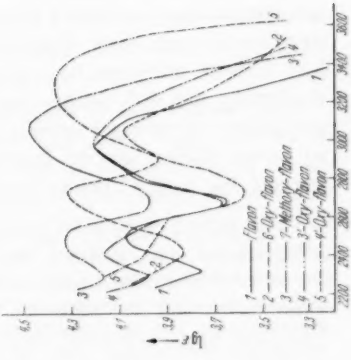


Abb. 3.

Die Bindung der Methylgruppe mit den OH-Gruppen der Flavone ändert das Spektrum entsprechend der Lage der Methoxylgruppe im Phenylbenzopyron-Gerüst. Die Absorptionsspektren des 6-Oxy- und 6-Methoxy-flavons, 5, 7-Dioxy- und 7-Methoxy-flavons, 2′-Oxy- und 2′-Methoxy-flavonols (Abb. 4, 1—6), des 3′-Methoxy-flavonols, 5, 7-Dioxy- und 5, 7-Dimethoxy-flavonols sind prinzipiell identisch; der Unterschied macht sich nur durch eine kleine Abschwächung der Extinktion bemerkbar. Verätherung der OH-Gruppen in der Stellung 5, 6, 7, 2′ und 3′ bei den Oxyflavonen ändert also das Spektrum nicht. In diesem Falle stimmen meine Ergebnisse mit denen der japanischen Forscher überein[1], auch sie haben keinen Unterschied in dem Spektrum der Flavonäther und der entsprechenden Oxyflavone gefunden, wenn das Radikal in Ätherform in der Stellung 5, 6, 7, 2′ und 3′ gebunden ist. Dasselbe gilt nach der japanischen Untersuchung auch für die in der Natur verbreiteten Flavonglykoside, die ein mit dem Spektrum der Aglykone identisches Spektrum haben sollen, wenn der Zuckerrest in der obengenannten Stellung gebunden ist. Das in unserem Laboratorium untersuchte Apiin, ein 7-Apioso-glykosid des 5, 7, 3′-Trioxyflavons ist durch ein mit dem Spektrum des Aglykons Apigenin[2] identisches Spektrum charakterisiert.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen über den Einfluß der Verätherung der OH-Gruppe in der Stellung 4′ des Flavongerüstes unterscheiden sich jedoch von den Ergebnissen der japanischen Autoren. Nach *S. Hattori* ist die Verätherung der OH-Gruppe bei $C_{4'}$ ohne Einfluß auf die Lage der Banden im Absorptionsspektrum. Es soll dies sowohl für 4′-Oxy-flavon und -flavonol wie auch für Poly-oxy-flavone mit der OH-Gruppe bei $C_{4'}$ gelten. Die von mir vorgenommenen Messungen zeigen, daß die Verätherung der OH-Gruppe bei $C_{4'}$ das Spektrum manchmal sogar bedeutend ändert[3]. Im Falle des 4′-Oxy- und 4′-Methoxy-flavonols ist diese Veränderung am geringsten (Abb. 5, 1 u. 2), hier kommt nur eine bedeutende Extinktionserniedrigung vor. Methylierung der OH-Gruppe am $C_{4'}$ in den Polyoxyflavonen ruft aber eine mehr oder weniger betonte Verschiebung des Bandes I in Richtung zu kurzen Wellen hervor. Instruktiv ist der Vergleich der Absorptionskurven des 5, 7, 4′-Trioxy- und 5, 7, 4′-Trimethoxy-flavons (Abb. 5,

[1] *S. Hattori*, Acta phytochimica japon. **4**, 41, 1928. — [2] *Marchlewski* u. *Skarżyński*, diese Zeitschr. **297**, 56, 1938. — [3] Ich muß bemerken, daß ich sehr oft deutliche Unterschiede in der Lage der von mir bestimmten Maxima der Absorptionsbanden von denen der japanischen Forscher festgestellt habe. Die japanischen Autoren geben die Lage der Banden in der reziproken Wellenlänge leider nicht genau an. Ihre Ergebnisse müssen in die üblich gebrauchte Skala umgerechnet werden. Die Absorptionskurven, welche die japanischen Forscher publizieren, stellen also ein anderes Bild dar als die meinigen, mit einer anderen Methode erhaltenen.

3 und 4), 5, 7, 4′-Trioxy- und 5, 7, 4′-Trimethoxy-flavonols (Abb. 15, 3 und 4), 2, 4′-Dioxy- und 2, 4′-Dimethoxy-flavons (Abb. 15, 1 und 2), 3′, 4′-Dioxy- und 3′, 4′-Dimethoxy-flavonols (Abb. 15, 5 und 6). Das Problem des Spektrums der Methoxyflavone ist um so wichtiger, als die japanischen Forscher auf Grund ihrer Ergebnisse sehr weitgehende Schlüsse für die praktische Anwendung ihrer Untersuchungen bei der Aufklärung der chemischen Struktur von methylierten Flavonen ziehen.

Der mit der OH-Gruppe verbundene Methylrest in Stellung 3 beim Flavon ändert den Charakter des Spektrums grundsätzlich, wie man aus dem Vergleich der Spektren des 3-Oxy-flavons und 3-Methoxy-flavons (Abb. 5, 5 und 6) ersehen kann. Nicht nur verschiebt sich das Band I in der Richtung zu kürzeren Wellen hin, sondern es ändert sich auch die Gestalt des Bandes.

Acetylierung der OH-Gruppen in den Oxy-flavonen verschiebt die Absorptionsbanden in der Richtung der kurzen Wellen, d. h. die OH-Gruppen verlieren nach dem Acetylieren ihren auxochromen Charakter. Die Spektren des 7-Acetoxy-, des 5, 7-Diacetoxy- und 7, 4′-Diacetoxy-flavons sind fast identisch mit dem Spektrum des Flavons (Abb. 6, 1, 2, 3 u. 4). Einen ganz verschiedenen Charakter nimmt aber das Flavonspektrum durch die Einführung des Acetylrestes in Stellung 3 an. Das 3-Acetoxy-flavon ist durch ein Spektrum charakterisiert, welches aus drei Banden mit Absorptionsmaxima bei 3480, 3050 und 2420 Å zusammengesetzt ist. Eine ähnliche Veränderung im Charakter des Spektrums nach Einführung des Acetylrestes in Stellung 3 kann man im Falle des 3, 5, 7, 2′-Tetraoxy-flavons (Datiscetin)[1] bemerken. Das Absorptionsspektrum des acetylierten Datiscetins, mit den Maxima bei 3960 und 2495 Å, unterscheidet sich wesentlich vom Spektrum des Datiscetins (Maxima bei 3750 und 2840 Å) und Flavons (Maxima bei 2975 und 2500 Å). Diese Unterschiede muß man einem eigenartigen Einfluß der Acetylgruppe in Stellung 3 zuschreiben.

Die Einführung mehrerer OH-Gruppen in den Flavonring vergrößert den auxochromen Effekt wesentlich. Man kann dies bis zu einem gewissen Grade als eine Addition der Spektralwirkungen, die die einzelnen OH-Gruppen in ihren verschiedenen Stellungen hervorrufen, auffassen. Manchmal aber kann man einen besonderen Effekt im Sinne einer Änderung des Spektrumcharakters beobachten. Im Spektrum des 5, 7-Dioxy-flavons (Chrysin) erleiden beide Absorptionsbanden eine bedeutende Verschiebung in Richtung zu langen Wellen, wobei jedoch die Höhe des Bandes II bedeutend wächst, Band I dagegen bedeutend niedriger wird. Im Verlauf der Absorptionskurve ist dieses Band nur

[1] *Grinbaumówna* u. *Marchlewski*, diese Zeitschr. **290**, 261, 1937.

als ein deutlicher Knick bemerkbar (Abb. 7, 1 u. 2). Im Spektrum des 6, 2′-Dioxy-flavons tritt der bathochrome Effekt der zwei OH-Gruppen noch deutlicher hervor, und zwar im Bereiche der beiden Banden (Abb. 7, 4). Doch zeigt im Spektrum des 3′, 4′-Dioxy-flavons die Verschiebung in Richtung zu langen Wellen nur das Band I an; Band II ist dagegen in den Abschnitt des Spektrums verschoben, welcher noch kurzwelliger ist als der analoge Abschnitt des Flavons (Abb. 7, 3).

Die Abb. 8 zeigt die Steigerung der auxochromen Wirkung der OH-Gruppe entsprechend der Zahl dieser Gruppen im Flavonmolekül. Besonders deutlich tritt dies im allmählichen Verschieben des Bandes I in Richtung zu langen Wellen hervor.

Wie schon oben erwähnt, ändert die Einführung der OH-Gruppe in Stellung 3 des Flavonringes, das ist der Übergang des Flavons in das Flavonol, die Struktur des Ultraviolettspektrums wesentlich. Die OH-Gruppe in Stellung 3 übt einen bedeutenden hypsochromen Einfluß auf Band II und einen batho- und hiperchromen auf Band I aus. Es erfolgt eine Verschiebung des Maximums der Absorption des Bandes I in Richtung zu langen Wellen um etwa 400 Å. Gleichzeitig tritt deutlich ein neues, drittes Absorptionsband (bedeutend niedriger als Band I) hervor, mit dem Maximum bei 3050 Å, d. h. also in demselben Abschnitt, wo sich das Maximum des Flavonspektrums befindet. Dieser Charakter des Ultraviolettspektrums tritt bei allen Homologen des Flavonols hervor. Alle Hydroxyflavonole sind durch das Absorptionsband I charakterisiert, welches bedeutend in der Richtung des sichtbaren Spektrums, im Vergleich mit Band I des Spektrums der betreffenden Homologen des Flavons, verschoben ist. Außerdem zeigt die Mehrzahl der Hydroxyflavonole im Absorptionsspektrum eine mehr oder weniger ausgeprägte Erhöhung der Extinktion bei 3050 Å an, also in demselben Abschnitt des Spektrums, welches das dritte Absorptionsband des Flavonols einnimmt. In einigen Fällen zeichnet sich die Absorptionskurve in diesem Abschnitt durch einen deutlichen Knick aus, in anderen tritt ein Absorptionsband hervor (3′-Oxy-flavonol, 7, 3′, 4′-Trioxy-flavonol).

Die Bindung der OH-Gruppe mit dem Methylrest läßt alle diese Merkmale des Spektrums zurücktreten: der Grundcharakter des Flavonspektrums tritt wieder hervor. Das Spektrum des Methoxyflavonols unterscheidet sich kaum vom Spektrum des Flavons; die deutliche Absorption im langwelligen Teile verschwindet, dagegen tritt ein merkliches Band in diesem Abschnitt auf, in welchem bei dem Flavonol das dritte Band steht. Den hypsochromen Effekt der Verätherung bei C_3 hat *S. Hattori*[1] an Hand von Messungen des Absorptionsspektrums

[1] *S. Hattori*, Acta phytochim. **4**, 74, 1925.

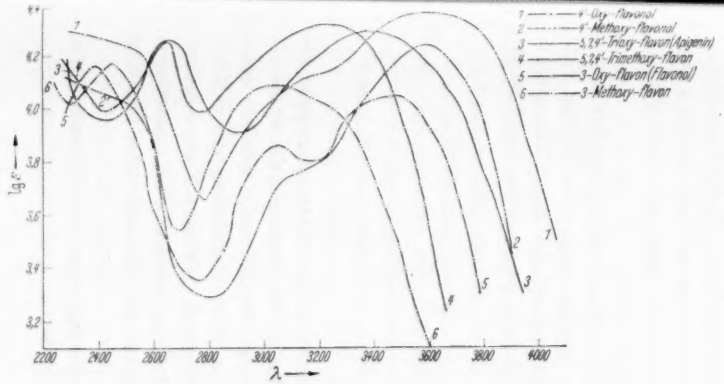


Abb. 5.

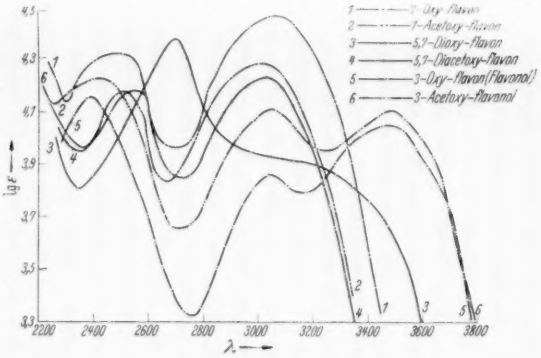


Abb. 6.

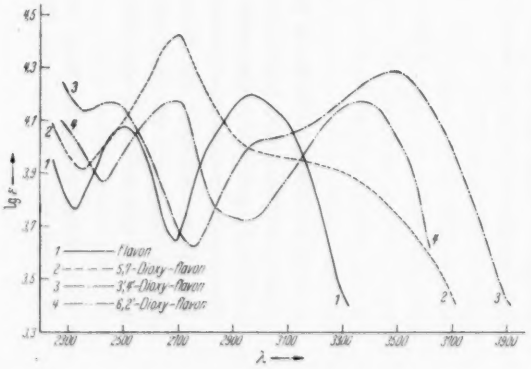


Abb. 7.

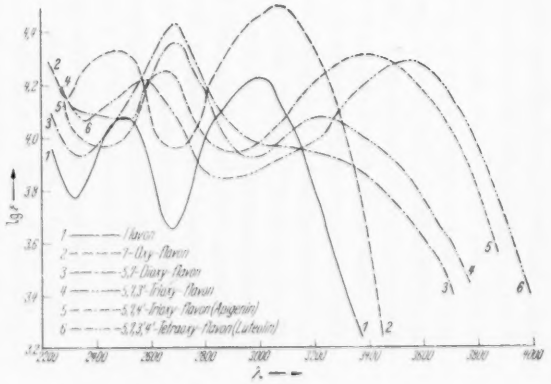


Abb. 8.

einer Reihe von natürlichen Flavonglykosiden, welche den Zuckerrest bei C_3 besitzen, bereits ausführlich beschrieben. In unserem Institut wurde dies im Falle des Quercitrins, das laut *Herzig* und *Schönbach*[1] ein 3-Rhamnosido-Quercetin ist, bestätigt. Das Band I des Quercetins liegt bei 3820 Å, das Band I des Quercitrins bei 3550 Å[2]. Auf dieser Grundlage baut *Hattori* seine Methode der spektroskopischen Analyse der Flavonglykoside, welche eine nähere Bestimmung der Struktur der Glykoside und deren Aglykonen erlauben soll, auf. Da nach *Hattori* die Verätherung der OH-Gruppe nur bei C_3 die Lage des Absorptionsbandes I ändert, sollten die Flavonglykoside, welche sich durch ihr Absorptionsspektrum von den betreffenden Aglykonen unterscheiden, Glykoside mit dem Zuckerrest bei C_3 sein. Die Flavone, deren Absorptionsband I sich nach vollständigem Methylieren ins Kurzwellige verschiebt, sollten danach 3-Oxy-flavone, d. h. Flavonole, sein. Ohne die Richtigkeit dieser Behauptungen — insofern sie sich auf den Einfluß der Zuckerreste bei C_3 auf das Flavonspektrum beziehen — zu bezweifeln, muß man beachten, daß derartige Schlüsse nur mit großer Vorsicht zu ziehen sind. Wie ich bereits betont habe, ruft manchmal die Verätherung der OH-Gruppe bei C_4, ebenfalls eine Änderung der Lage des Bandes I hervor, und zwar im hypsochromen Sinne. Eine Verschiebung des Bandes I ins Kurzwellige nach der Hydrolyse darf also bei der Frage nach der Stellung des Zuckerrestes nicht als eindeutig beweiskräftig angesehen werden.

Der deutliche Unterschied zwischen den Absorptionsspektren des Flavonols und des Methoxyflavonols beweist, daß diese beiden Verbindungen strukturchemisch voneinander verschieden sind. Wahrscheinlich liegt hier eine tautomere Umgruppierung vor im Sinne der Formel:

I II

Es ist bekannt, daß die Konjugation zweier Carbonylgruppen die Lichtabsorption ins Langwellige verschiebt. Man muß also die Formel II als Unterlage für das Absorptionsspektrum des Flavonols wählen. Beim Methoxyflavonol entspricht die chromophore Anordnung der o-Keto-Enol-Form, während im freien Flavonol die o-Diketo-Form vorliegt. Daraus folgt, daß die Struktur des Methoxyflavonols eher dem Flavon ähnlich sein sollte, als der Struktur des freien Flavonols. Im Einklang

[1] *Herzig* u. *Schönbach*, Arch. f. Chemie **33**, 1912. — [2] *L. Marchlewski* u. *B. Skarżyński*, diese Zeitschr. **297**, 96, 1938.

damit entspricht das Absorptionsspektrum des Methoxyflavonols und der 3-Glykosido-flavone dem Spektrum des Flavons, dagegen unterscheidet es sich deutlich vom Spektrum des Flavonols.

Die Mehrzahl der Flavonole mit freier OH-Gruppe bei C_3 zeigt noch ein drittes Absorptionsband oder wenigstens eine Verstärkung der Absorption bei 3100 Å, also in demjenigen Abschnitte des Spektrums, in welchem das Band I der Flavone sich befindet. Diese Erscheinung kann man auf zweierlei Weise deuten. Man kann erstens annehmen, daß in der Alkohollösung der Flavonole beide Formen dieser Verbindungen auftreten, sowohl die Diketo-Form wie auch die Keto-Enol-Form. Die Absorptionskurve sollte man in diesen Fällen als den Mittelwert der Absorption beider Formen auffassen. Je nach dem Charakter und der Lage der weiteren Substituenten im Flavongerüst würde sich das Gleichgewicht beider Formen mehr oder weniger zu Gunsten der Diketoform verschieben und gleichzeitig damit die Intensität der Absorption bei 3050 Å sich ändern.

Gegen diese Deutung könnte man das Spektrum des Flavons mit der Acetylgruppe bei C_3 anführen. Das Acetylflavonol zeigt ähnlich wie die bei C_3 nicht substituierten Flavonole ein aus 3 Banden zusammengesetztes Spektrum (Abb. 6, 6). Zwei Banden gleicher Intensität befinden sich in dem Wellenbereiche 3480 Å und 3050 Å. Man muß jedoch die Tatsache beachten, daß die Acylierung der OH-Gruppe im Flavonring nicht nur die auxochromen Eigenschaften rückgängig macht, wie das die japanischen Forscher behaupten und meine eigenen Messungen bestätigen (7-Acetoxy-flavon, 5, 7-Diacetoxy-flavon, 7, 4′-Diacetoxyflavon), sondern auch den Charakter des Spektrums ändert, indem sie bathochrom auf Band I wirkt (Tetra-acetoxy-datiscetin). Es ist möglich, daß man die Eigenart des Spektrums von Acetoxyflavonol der Struktur des Moleküls im ganzen und nicht dem Einflusse der Acetylgruppe auf die auxochromen Eigenschaften der OH-Gruppe bei C_3 zuschreiben muß. Die dreigipfelige Absorptionskurve der Flavonole ist jedoch auch einer anderen Deutung zugänglich. Es ist nicht ausgeschlossen, daß das zweigipfelige Spektrum des nicht substituierten Flavonols mit den Absorptionsmaxima bei 3100 und 3500 Å ein charakteristisches Kennzeichen der o-Dicarbonyl-Gruppierung im Molekül des Benzopyrons ist. In diesem Sinne spricht das Absorptionsspektrum des 7, 8-Dioxyflavonols (Abb. 11, 2). Dieses Spektrum ist durch drei Absorptionsbanden charakterisiert, deren Maxima sich bei 2650, 3125 und 3600 Å befinden. Nach Einführung des Methylrestes in die OH-Gruppen bei C_7 und C_8 kehrt das typische Bild des Spektrums des Flavonols wieder; 7, 8-Dimethoxy-flavonol wird durch zwei Absorptionsbanden bei 3530 und 2560 Å und einen deutlichen Knick der Kurve bei 3100 Å charakterisiert. Auch in diesem Falle könnte man die Abänderung der

Lichtabsorptionskurve durch die Tautomerie der o-chinoiden und o-Diphenyl-Struktur erklären. Eine derartige Auffassung stößt aber auf bedeutende Schwierigkeiten. Die Einführung weiterer OH-Gruppen in den Kern des 7, 8-Dioxy-flavonols läßt das charakteristische dreibandige Spektrum verschwinden. Das 7, 8, 4′-Trioxy-flavonol (Abb. 13, 3) und das 7, 8, 3′, 4′-Tetraoxy-flavonol zeigen ein den Spektren anderer Flavonole analoges Spektrum, d. h. nur zwei Absorptionsbanden.

Im Zusammenhang mit dem Gesagten muß ich bemerken, daß *S. Hattori* im Spektrum des 7, 8-Dioxy-flavons nur ein Band bei 2700 Å beschreibt. Es wäre merkwürdig, wenn die OH-Gruppe bei C_3 im 7, 8-Dioxy-flavonol das Spektrum des 7, 8-Dioxy-flavons in einem solchen Maße modifizieren sollte. Da *Hattori* sich nicht mit dem 7, 8-Dioxy-flavonol befaßte, ich aber nicht über ein Präparat von 7, 8-Dioxy-flavon verfügte, bleibt diese Frage einstweilen offen.

Die Einführung einer OH-Gruppe in das Flavonolgerüst ändert das Absorptionsspektrum in analoger Weise wie bei den Mono-oxy-flavonen. Der bathochrome Einfluß des OH bei C_6 und C_7 auf das Band I ist zwar in diesem Falle schwach angedeutet, entsprechend der großen Verschiebung ins Langwellige, die dieses Band bereits im Spektrum des Flavonols aufweist, es tritt jedoch eine parallele Verschiebung des Bandes II sehr deutlich hervor. Die OH-Gruppe bei $C_{4'}$ ruft eine weitere Verschiebung des Bandes I in Richtung zu langen Wellen hervor, wobei im Spektrum des 4′-Oxy-flavonols, ähnlich wie im Spektrum des 4′-Oxy-flavons, das Band II im Spektrumbilde eine Verwischung erleidet (Abb. 10, 5 u. 6). Die Abb. 10 zeigt diese Analogien zwischen den Spektren der Mono-oxy-flavone und der Mono-oxy-flavonole, wobei die Verlagerung des Bandes I der Flavonole ins Langwellige beim Vergleich mit dem Spektrum der Flavone leicht bemerkbar ist.

Die gleiche Erscheinung kann man in den Spektren der Poly-oxy-flavonole wiederfinden. Das Band I ist im Spektrum dieser Verbindungen im Vergleich mit der Lage dieses Bandes bei den entsprechenden Flavonen stets verschoben (Abb. 11 bis 14). Der bathochrome Einfluß der OH-Gruppe bei C_3 betrifft fast ausschließlich das Band I. Das Band II nimmt in den meisten Fällen die gleiche Lage ein, wie stets im Falle der entsprechenden Flavone. Deshalb ist der Abstand zwischen den Maxima der beiden Absorptionsbanden im Flavonolspektrum immer größer als im analogen Spektrum der Flavone. Im Spektrum der Poly-oxy-flavone beträgt dieser Abstand 600 bis 970 Å, im Spektrum der Poly-oxy-flavonole beträgt er 925 bis 1245 Å. Außerdem kann die OH-Gruppe bei C_3 in Flavonolen gewissermaßen die Gestalt der Absorptionskurve modifizieren. Darüber belehrt der Vergleich der Spektren des Chrysins (5, 7-Dioxy-flavon) und des Galangins (5, 7-Dioxy-

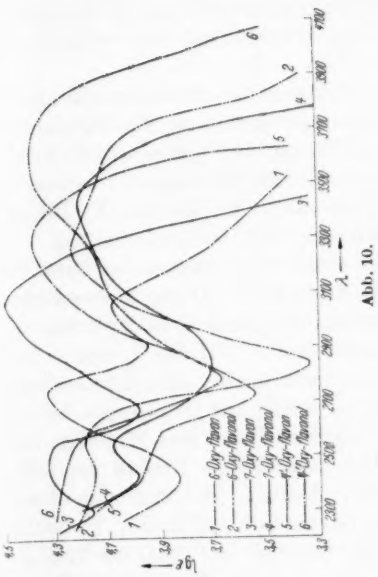


Abb. 10.

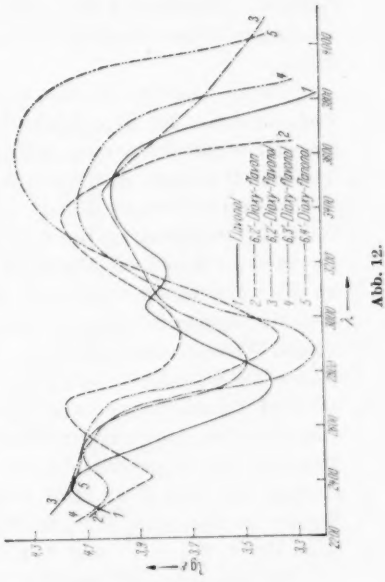


Abb. 12.

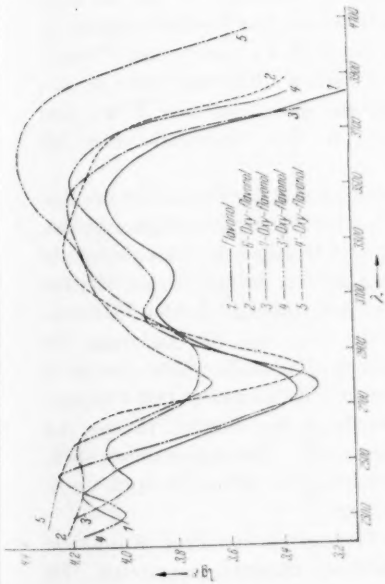


Abb. 9.

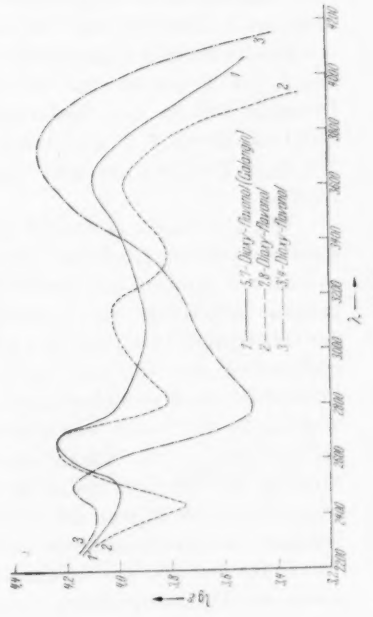


Abb. 11.

flavonol). Das Band I des Galanginspektrums ist nicht nur in Richtung zu langen Wellen verschoben, sondern es erreicht auch eine viel größere Höhe.

Da die Lage des Bandes II im Spektrum der Flavonole sich nicht bedeutend von der Lage dieses Bandes im Spektrum der Flavone unterscheidet, ergibt sich daraus, daß die OH-Gruppe bei C_3 keinen Einfluß auf das Band II ausübt. Auch die Anwesenheit einer OH-Gruppe in Stellung 7 des Benzopyronringes ändert nicht die Lage des Bandes II. Dieses Band fällt im Spektrum des 7-Oxy-flavons, 7-Oxy-flavonols und 7, 3′, 4′-flavonols in denselben Abschnitt des Spektrums, welchen das Band II im Flavonspektrum einnimmt, d. h. bei 2500 Å. Dagegen verschiebt die OH-Gruppe in Stellung 5 bedeutend das Band II in Richtung zu langen Wellen; einen ähnlichen Einfluß übt — OH bei C_8 und — im schwächeren Grade — bei C_6 aus. Das Spektrum der acht untersuchten Di- und Tri-oxy-flavone und -flavonole, welche die OH-Gruppe bei C_5 oder C_8 haben, ist durch ein Absorptionsband II mit dem Maximum bei 2600 bis 2700 Å gekennzeichnet. Der bathochrome Einfluß der OH-Gruppe bei C_6 auf Band II ist weniger einheitlich. Das Maximum dieses Bandes im Spektrum des 6, 2′-Dioxy-flavons fällt auf 2680 Å, im Spektrum der 6, 2′-, 6, 3′- und 6, 4′-Dioxy-flavonole auf 2500 bis 2600 Å.

Die einzelnen OH-Gruppen im Phenylrest der Flavone und Flavonole beeinflussen im allgemeinen die Lage des Bandes II nicht. Ausnahmsweise üben die zwei OH-Gruppen in Stellung 3′, 4′ auf die Lage des Bandes II einen hypsochromen Einfluß aus. Das Absorptionsband II des 5, 7, 4′-Trioxy-flavons wie auch des 5, 7, 4′- und 7, 8, 4′-Trioxy-flavonols fällt in den Spektrumteil zwischen 2650 und 2675 Å, das Band II des 5, 7, 3′, 4′-Tetraoxy-flavons sowie des 5, 7, 3′, 4′- und 7, 8, 3′, 4′-Tetraoxy-flavonols dagegen in den Spektralbereich bei 2575 Å.

Wie aus obigem erkennbar ist, zeichnet sich der Charakter des Absorptionsspektrums im Ultravioletten durch einige Regelmäßigkeiten aus, welche von der Zahl und Stellung der OH-Gruppen im Flavonring abhängen. Ich betone hier nochmals den großen bathochromen Einfluß der OH-Gruppe bei C_3 und den großen Unterschied der beiden Flavonolspektrumbanden von den Spektren der Flavone; die Änderung des Charakters des Flavonolspektrums nach Einführen des Alkoholrestes in Stellung 3; den batho- und hypsochromen Einfluß zweier OH-Gruppen bei C_3 und C_4; die Abhängigkeit der Lage des Bandes II von der Stellung der OH-Gruppen im Benzopyronkern. Die aufgezählten spektralen Merkmale können bei der Erforschung der Struktur noch unbekannter Flavonverbindungen nützlich sein.

Unter den von mir untersuchten Präparaten von Prof. *Kostanecki* waren die Flavanone durch einige Methoxy-Homologe vertreten. Da

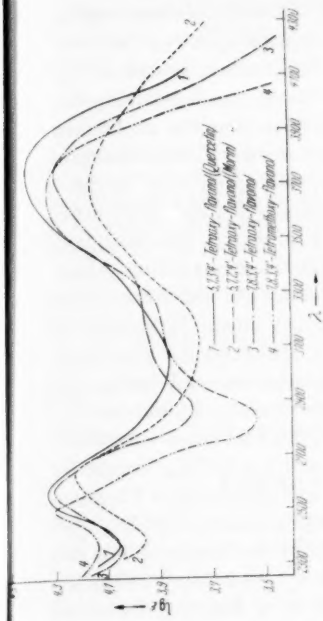


Abb. 14.

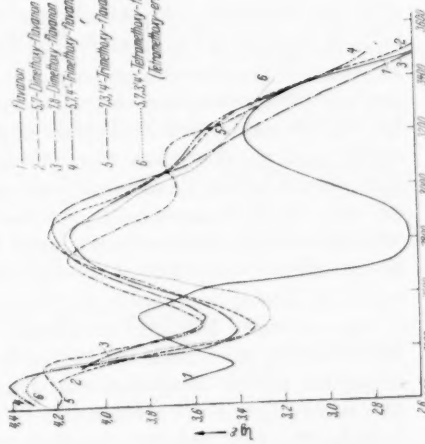


Abb. 16.

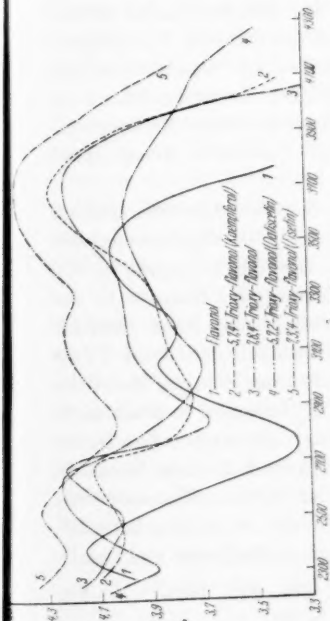


Abb. 13.

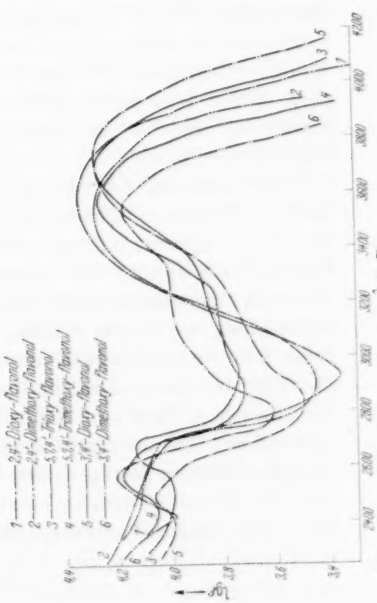


Abb. 15.

sich bei der Untersuchung der Flavon- und Flavonolspektren ergeben hatte, daß Unterschiede zwischen den Absorptionsspektren der Oxy- und Methoxy-flavone nur in Ausnahmefällen vorkommen, glaubte ich aus der spektrographischen Analyse der Methoxy-flavanone Aufschlüsse über den Charakter des Spektrums der Oxy-flavanone erhalten zu können.

Im Vergleich zu dem Absorptionsspektrum des Flavons zeichnet sich das zweibandige Spektrum des Flavanons durch eine merklich kleinere Extinktion aus, außerdem ist das Band I bedeutend in Richtung zu langen Wellen verschoben (Abb. 2). Die Einführung von Methoxylgruppen (und wahrscheinlich auch die von OH Gruppen) ändert scheinbar den Charakter des Spektrums grundlegend. Die Extinktion wird erhöht und ein deutliches Absorptionsband mit einem Maximum bei 2850 Å tritt hervor. Außerdem erscheint im Spektrum der Flavanone die eine OCH_3-Gruppe bei $C_{4'}$ besitzen, ein scharfes und hohes Absorptionsband im Abschnitt der ganz kurzen Wellen. In diesem Teil des Spektrums, welches der Lage des Bandes I des Flavanons entspricht, zeigen die Absorptionskurven der Flavanone mit der OCH_3-Gruppe bei C_5 eine schwache Biegung, das einzige von mir untersuchte Flavanon mit freiem C_5 zeigt noch ein kleines besonderes Band (Abb. 16). Die Ergebnisse meiner Messungen sind grundsätzlich im Einklang mit den Absorptionskurven des Hesperidins (5, 3′-Dioxy-4′-methoxy-7-rhamnoglykosid-flavanon) und des Eriodictyols (5, 7, 3′, 4′-Tetraoxy-flavanon) nach *S. Lajos* und *M. Gerendas*[1], sowie mit den Absorptionskurven des Naringenins (5, 7, 4′-Trioxy-flavanon) und Hesperetins (5, 7, 3′-Trioxy-4′-methoxy-flavanon), die *A. Asahino* und *M. Inabuse*[2] mitgeteilt haben. Jedoch ließen diese Forscher ein sehr deutliches Absorptionsband im kurzwelligen Teile des Spektrums außer acht; wenigstens ist schwer anzunehmen, daß erst die Methylierung dieser Flavanone dieses Band hervortreten ließe.

Der Vergleich der Absorptionsspektren der von mir untersuchten Methoxy-flavanone erlaubt folgende Schlüsse. Die Einführung der Methoxy-Gruppen (und wahrscheinlich auch der OH-Gruppen) in den Flavanonkern erhöht die Extinktion im Bereich des Bandes II des Flavanons bedeutend und verschiebt zugleich dieses Band deutlich in Richtung zu langen Wellen, dabei verschwindet das Band I fast vollständig und macht sich nur als eine mehr oder weniger deutliche Biegung bemerkbar. Die Einführung der OCH_3-Gruppen in Stellung 4′ des Flavanons führt zum Auftreten eines neuen Absorptionsbandes im kurzwelligen Teil des Spektrums. Es ist möglich, daß dieses Band ein charakteristisches Merkmal der Spektren aller Methoxy-flavanone ist, sich aber so weit in dem kurzwelligen Bereiche des Spektrums befindet, daß es mit den gewöhnlichen spektralanalytischen Methoden nicht mehr

[1] *S. Lajos* u. *M. Gerendas*, diese Zeitschr. **291**, 220, 1937. — [2] Zit. nach *Klein*, Handb. d. Pflanzenanalyse III/2, S. 295.

erfaßt wird. Die Methoxy-Gruppe bei C 4′ übt auf dieses Band einen bathochromen Einfluß aus und verschiebt es in den photographisch reproduzierbaren Abschnitt des Spektrums.

Experimenteller Teil.

Zu den oben beschriebenen Untersuchungen benutzte ich synthetisch erhaltene Präparate von Flavonderivaten aus dem Nachlaß von Prof. *S. Kostanecki*. Die Menge der Substanzen, über die ich verfügte, schwankte in einzelnen Fällen zwischen 40 und 200 mg, was die Reinigung der Substanzen für photometrische Messungen bedeutend erschwerte. Eine besondere Reinigung der Präparate erschien jedoch nur ausnahmsweise notwendig, denn fast immer stimmte der Schmelzpunkt mit den Angaben der Literatur.

Die Aufnahmen machte ich mit Alkohollösungen der einzelnen Präparate und zeichnete die Absorptionskurven auf Grund der Aufnahmen von mindestens zwei verschiedenen Lösungskonzentrationen.

Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des *Hilger*schen Spekker-Spektrographen, mit Wolfram-Stahlelektroden als Lichtquelle, gemacht.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Alkoholische Lösungen der Flavone weisen im ultravioletten Lichte zwei Absorptionsbanden auf. Das eine davon (Band I) liegt im langwelligen Bereiche des Spektrums, zwischen 2900 und 3800 Å, das andere dagegen im kurzwelligen Bereiche zwischen 2300 und 2800 Å (Band II). Diese Eigenart des Absorptionsspektrums ist durch die Anwesenheit des Benzopyron-Gerüstes bedingt und findet sich bereits im Spektrum der Chromone vor.

2. Das Band I wird durch Einführung von OH-Gruppen in die Flavone bathochrom beeinflußt. Am deutlichsten verschieben die OH-Gruppen das Band I in Richtung des langwelligen Spektrumbereiches, wenn sie sich in der Lage 3 bzw. 4′ befinden. Mit zunehmender Anzahl der OH-Gruppen nimmt auch die bathochrome Wirkung zu. Auch das Band II kann zu längeren Wellen verschoben werden, und zwar durch OH-Gruppen in Stellung 5, 6 bzw. 8.

3. Die OH-Gruppe in Stellung 3 hat in vielen Fällen neben dem bathochromen Einfluß auf das Band I auch das Auftreten eines zusätzlichen Absorptionsbandes bei etwa 3100 Å zur Folge. Alle 3-Oxyflavone (Flavonole) zeigen ausnahmslos und unabhängig von der Lage der sonstigen Substituenten den folgenden Verlauf der Absorptionskurven: das Band I ist stets in den Bereich der längeren Wellen verschoben, bei 3100 Å ist die Absorption oft verstärkt. Im Absorptionsspektrum aller Flavonole ist die Entfernung zwischen den beiden Bändern größer als bei den Flavonen.

4. Die Verätherung der Hydroxylgruppen in Stellung 5, 6, 7, 2′ und 3′ ändert das Absorptionsverhalten der entsprechenden Oxyflavone nicht. Die Verätherung der OH-Gruppe bei $C_{4'}$ hat in vielen

Tabellarische Zusammenstellung der Absorptionsmaxima der Flavonverbindungen.

	Band I		Band II	
	Maximum Å	Log ε	Maximum Å	Log ε
Flavon	2975	4,20	2500	4,07
6-Oxy-flavon	3050	4,07	2730	4,32
7-Methoxy-flavon	3060	4,49	2475	4,12
3'-Oxy-flavon	2975	4,21	2415	4,15
4'-Oxy-flavon	3300	4,37	2550	3,92
5, 7-Dioxy-flavon	3300	3,90	2700	4,42
6, 2'-Dioxy-flavon	3360	4,16	2680	4,17
3', 4'-Dioxy-flavon	3450	4,28	2450	4,17
5, 7, 3'-Trioxy-flavon	3225	4,07	2700	4,36
5, 7, 4'-Trioxy-flavon (a)	3400	4,31	2650	4,25
5, 7, 3', 4'-Tetraoxy-flavon	3550	4,28	2580	4,22
6-Methoxy-flavon	3050	4,07	2730	4,32
5-Oxy-7-methoxy-flavon	3300	3,88	2700	4,40
5, 7, 4'-Trimethoxy-flavon	3250	4,33	2650	4,25
7-Acetoxy-flavon	3010	4,27	2510	4,18
5, 7-Diacetoxy-flavon	3025	4,43	2550	4,18
7, 4'-Diacetoxy-flavon	3040	4,34	2520	4,17
Apiin (a)	3410	4,29	2670	4,17
Flavonol	3475 3050	4,04 3,86	2390	4,14
6-Methoxy-flavonol	3275	4,22	2560	4,18
7-Oxy-flavonol	3450	4,19	2550	4,07
3'-Oxy-flavonol	3525 3050	4,19 3,92	2460	4,15
4'-Oxy-flavonol	3600 3075	4,39	2550	4,20
6, 2'-Dioxy-flavonol	3460 3075	4,02	2550	4,10
6, 3'-Dioxy-flavonol	3450	4,13	2520	4,02
6, 4'-Dioxy-flavonol	3600	4,25	2600	4,09
5, 7-Dioxy-flavonol	3600	4,07	2675	4,23
7, 8-Dioxy-flavonol	3600 3125	3,96 4,02	2650	4,17
3', 4'-Dioxy-flavonol	3730	4,29	2500	4,17
5, 7, 2'-Trioxy-flavonol	3600	3,99	2625	4,14
5, 7, 4'-Trioxy-flavonol	3700 3100	4,28	2675	4,12
7, 3', 4'-Trioxy-flavonol	3700 3150	4,43 4,22	2525	4,33
7, 8, 4'-Trioxy-flavonol	3700 3100	4,22	2675	4,12
5, 7, 2', 4'-Tetraoxy-flavonol (b)	3800	4,15	2630	4,22
5, 7, 3', 4'-Tetraoxy-flavonol (b)	3820	4,42	2575	4,34
7, 8, 3', 4'-Tetraoxy-flavonol	3750 3100	4,28	2575	4,30
2'-Methoxy-flavonol	3525 3030	4,15 3,96	2450	4,25
4'-Methoxy-flavonol	3600 3075	4,24	2550	
3-Methoxy-flavonol	3050	4,08	2450	4,17
6, 4'-Dimethoxy-flavonol	3540	4,28	2675	4,04

Tabellarische Zusammenstellung usw. (Fortsetzung).

	Band I		Band II	
	Maximum Å	Log ε	Maximum Å	Log ε
3', 4'-Dimethoxy-flavonol	3550	4,18	2560	4,21
5, 7, 4'-Trimethoxy-flavonol	3550	4,24	2560	4,15
7, 3', 4'-Trimethoxy-flavonol	3600 3100	4,25	2460	4,10
7, 8, 2'-Trimethoxy-flavonol	3360	3,96	2460	4,28
7, 8, 3', 4'-Tetramethoxy-flavonol	3660	4,33	2500	4,30
3-Acetoxy-flavonol	3480 3050	4,11 4,11	2420	4,23
5, 7, 2', 4'-Tetraacetoxy-flavonol (b)	3960	3,56	2495	4,18
Quercitrin (a)	3550	4,12	2600	4,22
Flavanon	3200	3,34	2520	3,84
5, 7-Dimethoxy-flavanon			2850	4,23
7, 8-Dimethoxy-flavanon			2870	4,22
5, 7, 4'-Trimethoxy-flavanon			2830	4,12
			2280	4,42
7, 3', 4'-Trimethoxy-flavanon			2750	4,33
			2340	4,38
5, 7, 3' 4'-Tetramethoxy-flavanon			2850	4,23
			2280	4,35
7-Oxy-chromon	3000	4,10	2470	4,25
			2415	4,22
7-Äthoxy-2-methyl-chromon	2970	4,04	2475	4,20
			2415	4,17
7, 8-Dioxy-chromon	3000	4,12	2575	4,50
7-Methoxy-2-benzyl-chromon	2950	3,94	2480	4,19
			2415	4,17

(a) *Marchlewski* u. *Skarżyński*, diese Zeitschr. **297**, 56, 1938.
(b) *Grinbaumówna* u. *Marchlewski*, ebenda **290**, 261, 1937.

Fällen eine hypsochrome Auswirkung auf das Band I. Die Verätherung der OH-Gruppe in Stellung 3 ändert das Spektrum grundlegend, indem das Band I nach den kürzeren Wellen verschoben wird und die Eigenart des Flavonspektrums sich wieder einstellt.

5. Die Acetylierung der OH-Gruppen setzt die auxochrome Wirkung derselben herab. Sie kann jedoch dem Molekül auch neue spektrale Merkmale verleihen.

6. Das Absorptionsspektrum einer Reihe von natürlichen Flavonen wurde beschrieben. Die Meßergebnisse bieten die Möglichkeit, die natürlich vorkommenden Flavone auf spektralanalytischem Wege aufzufinden, zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen.

7. Die hier untersuchten Flavanone haben ein ausgesprochenes Absorptionsband bei 2850 Å, eine sehr schwach angedeutete Absorptionsverstärkung zwischen 3100 und 3200 Å und in manchen Fällen ein scharf ausgebildetes Absorptionsmaximum zwischen 2260 und 2300 Å.

Herrn Prof. Dr. *L. Marchlewski* möchte ich für sein immer reges Interesse an meiner Arbeit meinen besten Dank aussprechen.

Über die Ausnutzung der Pentosen bei der biologischen Eiweißsynthese.

IV. Mitteilung:

Züchtung von Torula utilis in Xylose und Xylose-Glucose-mischungen.

Von

Richard Lechner.

(Aus dem Institut für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 3. April 1939.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In der letzten Mitteilung (1) wurde über die erfolgreiche Züchtung von Torula utilis in Xylose sowie in Galaktose und Mannose kurz berichtet. Torula utilis vermag demnach alle im Holz vorkommenden Kohlenhydrate zu verwerten. Von einer Reihe von Einzelzüchtungen und einer Dauerzüchtung mit zehn Führungen in Xylose sowie von Züchtungen in Hexosen-Pentosenmischungen wurden die Hefetrockensubstanzausbeuten bezogen auf die Xylosedifferenz angegeben. Schon bei früheren Untersuchungen war festgestellt worden, daß Torula utilis beim Einimpfen in sterile Xyloselösung im Kölbchen ohne Lüftung anwächst und sich vermehrt. Dagegen konnte seinerzeit bei Lüftungen kein Hefezuwachs nachgewiesen werden, obwohl in jedem Falle ein Teil der angewandten Xylose nach Beendigung der Lüftung verschwunden war. Als das Verhalten der Torula utilis bei Lüftung in Xylose im Oktober vorigen Jahres erneut überprüft wurde, ließ sich zur großen Überraschung die Torulahefe in reiner Xylose ohne weiteres züchten. Da im Vergleich zu vorangegangenen Versuchen keinerlei besondere Maßregeln angewandt wurden, war das Ergebnis zunächst verblüffend. Es stand aber einwandfrei fest, daß nun Torula utilis in Xylose im Lüftungsverfahren gezüchtet werden und somit Torula utilis Xylose zum Zellaufbau verwerten konnte. Die Ursache der Änderung des Verhaltens der Torula utilis gegenüber Xylose unter den Bedingungen der Lüftung war jedoch unbekannt. Wir standen der Allgemeingültigkeit des Befundes zunächst noch skeptisch gegenüber und veröffentlichten die in unserer zweiten Mitteilung (2) beschriebenen Versuche, bei denen der Beweis für eine Ausnutzung der Xylose in synthetischen Zuckergemischen durch Torula utilis nicht erbracht werden konnte. Um den Grund des positiven Verhaltens der Torula utilis aufzufinden, wurde eine Reihe von Versuchen angestellt. Es sei hier gleich vorweg ge-

nommen, daß es bis jetzt nicht gelungen ist, die Ursache des Vermögens der Torula utilis Xylose bei Lüftung zum Zellaufbau zu verwerten, zu ermitteln.

Im folgenden wird über Versuchsanstellung, Zielsetzung und Beobachtungen bei den einzelnen in der letzten Mitteilung aufgeführten Versuchen eingehend berichtet und die Schlußfolgerungen aus den Versuchsergebnissen erörtert.

Versuchsteil.

Ein Teil der Züchtungsversuche wurde in der von *H. Fink*, *R. Lechner* und *J. Krebs* (3) angegebenen Apparatur unter sogenannten Standardbedingungen (4) ausgeführt. Für die nach der Standardmethode durchgeführten Züchtungen wird auf die entsprechenden Vorschriften verwiesen. Um den Xyloseverbrauch pro Züchtung herabzusetzen, wurden in Abänderung der Bedingungen sog. halbe Standardzüchtungen mit der halben Zuckermenge durchgeführt. Nährsalz-, Stellhefe-, Flüssigkeitsmenge usw. wurden ebenfalls sinngemäß halbiert.

Obwohl bei Einhaltung der Standardbedingungen günstigere Voraussetzungen für die Erreichung von Höchstausbeuten gegeben waren, wurde zur weiteren Einschränkung des Xyloseverbrauchs zur Lüftung in Weithalsflaschen von 3 Liter Inhalt übergegangen. Die Flaschen waren mit einem durchbohrten Gummistopfen, durch den die Luftzuleitungen und die Ableitung der Gärgase geführt wurde, verschlossen. Zur Belüftung in den Gärflaschen dienten Gasverteiler mit Jenaer Glasfilterplatten G 0 und G 3 in Löffelform (5). Die für normale Züchtungen angewandte Zuckermenge betrug 20 g. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

20 g Kohlenhydrat 1,1 g Diammonphosphat 2,0 g Ammonsulfat 0,6 g Kaliumsulfat 0,9 g Magnesiumsulfat	gelöst in 1 Liter Leitungswasser.

Die Stellhefemenge betrug 7,0 g. Zu Beginn der Züchtung wurden 300 ccm Wasser und 300 ccm Nährlösung vorgelegt. Die übrige Nährlösung und 0,4 g Stickstoff in Form von verdünntem Ammoniak wurden im Zulauf gegeben.

Bei langen Gärzeiten über 10 Stunden wurden die Lüftungen unterbrochen, über Nacht im Eisschrank aufbewahrt und die Züchtung am nächsten Tage wieder fortgesetzt. Es stellte sich heraus, daß diese Arbeitsweise nicht nachteilig ist. Nur muß am zweiten Tage nochmals eine Angärzeit in Kauf genommen werden.

Wenn nicht anders vermerkt, wurde als Kohlenhydrat stets Xylose der Deutschen Bergin A.-G.[1], aus Buchenholz hergestellt, verwendet. Da diese Xylose nicht ganz rein war, wurde in der fertigen Nährlösung der Xylosegehalt analytisch bestimmt. Für die Xylosebestimmung wurden geringe Mengen der Nährlösung verbraucht.

---

[1] Der Deutschen Bergin A.-G., Mannheim-Rheinau, danken wir für die Überlassung von Xylose.

In Sonderfällen wurden verwendet:

Xylose, rein, rechtsdrehend, von *Schering*,
Traubenzucker, reinst, wasserfrei, D. A. B. 6, von *Schering*,
Holzzucker, hergestellt nach dem Bergius-Rheinau-Verfahren.

Hinsichtlich der Analytik wird auf *R. Lechner* und *R. Illig* (2) verwiesen. Die Kohlenstoffbestimmung wurde nach einer modifizierten Methode ausgeführt (6). Bei den Züchtungen mit Kohlenstoffbilanz werden verschiedene Abänderungen und Zusätze getroffen. Die entstehende Kohlensäure wird bestimmt; für die Bereitung der Nährlösung, zum Spülen usw. wird nur aufgekochtes destilliertes Wasser verwendet; zur Nährlösung werden zusätzlich 2 Tropfen Ferrisulfat, 200 ccm Gipswasser und 30 ccm Hefeaschenauszug zugesetzt; am Ende der Gärung wird eine halbe Stunde mit Stickstoff nachgelüftet usw. (6).

Die Versuchsbeschreibungen und Ergebnisse sind in drei Abschnitte: Einzelzüchtungen in Xylose, Dauerzüchtung in Xylose und Züchtungen in Glucose-Xylosemischungen aufgeteilt. Schließlich wird noch kurz über die Züchtungen in Mannose und Galaktose berichtet.

Einzelzüchtungen in Xylose.

Im Hinblick auf das negative Verhalten der Torula utilis bei den früheren Lüftungsversuchen in Xylose sollte nochmals genau untersucht werden, ob und in welchem Maße bei Lüftung von Torula utilis in Xylose Sprossung eintritt (Versuch 1). Zu diesem Zwecke wurde eine in Holzzucker geführte Torulahefe nochmals in Holzzucker vorgezüchtet und gegen Ende der Lüftung darauf hingesteuert, eine möglichst ausgereifte, d. h. eine möglichst wenig unausgewachsene Sproßzellen besitzende Hefe zu erhalten. Die geerntete Hefe wurde nun als Stellhefe für die Xylosezüchtung verwendet. Um die Sprossung zu verfolgen, wurde im Laufe der Lüftung zeitweilig durch Auszählen mit der Zählkammer der Anteil der sprossenden Zellen bestimmt. Wider Erwarten und entgegen allen früheren Feststellungen sproßte die Hefe nach einigen Stunden lebhaft und vermehrte sich. Es zeigte sich das charakteristische Gärbild der Hefezüchtung, nämlich Verschiebung des p_H und des Säuregrades nach der sauren Seite und der frische Gärgeruch. Die Belüftungsdauer wurde auf $13^1/_2$ Stunden ausgedehnt. Der Anteil der sprossenden Zellen änderte sich im Verlaufe der Züchtung. Die Änderung ist aus der

Tabelle I.

Gärzeit in Stunden	Anteil der sprossenden Zellen in %
0	11
1	11
3	45
6	30
Unterbrechung der Lüftung	
8	15
10	15
12	13
$13^1/_2$	10

Tabelle I ersichtlich. Die bald nach Beginn einsetzende lebhafte Sprossung ließ nach einiger Zeit wieder nach. Die Unterbrechung der Lüftung wird dabei kaum von Einfluß gewesen sein, denn es wurde eine sehr hohe Ausbeute erzielt. Die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz und Rohprotein sind in der Tabelle II niedergelegt.

Die weitere Aufgabe bestand nun zunächst darin, die Ursache des entgegen den früheren Erfahrungen wider Erwarten festgestellten positiven Verhaltens der Torula utilis bei Lüftung in Xylose aufzuklären.

Bei dem vorstehend beschriebenen Versuch 1 war Xylose der Deutschen Bergin A.-G., die nicht ganz rein war, verwendet worden, während die früheren negativen Versuche mit reiner Xylose von *Schering* ausgeführt worden waren. Ein Vergleichsversuch 2 mit reiner Xylose von *Schering* verlief aber auch positiv. Irgendwelche auf die Hefe katalytisch oder stimulierend wirkende Stoffe in der unreinen Xylose kamen also nicht in Betracht. Für die folgenden Versuche wurde deshalb wieder Xylose der Deutschen Bergin A.-G. verwendet. Nun wurde der Grund in einer besonderen Stellhefe gesucht. Die bei den Versuchen 1 und 2 verwendete Hefe war in einem besonders stark chloridhaltigen Holzzucker (27,5% $CaCl_2$ auf vergärbaren Zucker bezogen) in einer großen Anzahl von Führungen hergezüchtet und vorgezüchtet worden. Auf Grund der biologischen Untersuchung war die Hefe als normale Torula utilis ohne Infektion zu bezeichnen. Nun wurde eine in normalem Holzzucker (7,8% $CaCl_2$ auf vergärbaren Zucker bezogen) hergeführte und vorgezüchtete Hefe, die ebenfalls als normale Torula utilis ohne Infektion anzusprechen war, als Stellhefe für die Xylosezüchtung (Versuch 3) verwendet. Auch hier verlief die Züchtung positiv. Eine andere in Holzzucker im Großbetrieb gezüchtete Torula utilis[1] von gutem physiologischen Zustand wuchs ebenfalls in Xylose, jedoch wurden die vordem erzielten Ausbeuten nicht ganz erreicht und die Xylose auch nicht ganz ausgenutzt (Versuch 4). Die nächste Folgerung war, daß bei der lange Zeit in Holzzucker geführten Torula utilis allmählich eine Anpassung eingetreten und die Fähigkeit, Xylose anzugreifen und zu verwerten, allmählich ausgebildet worden ist. Solche Gedankengänge wurden schon früher, allerdings mit negativem Ergebnis, verfolgt. Aus der biologischen Sammlung des Instituts wurde nun Torula utilis von der Agarkultur in Melassenährlösung abgeimpft und dann in drei Führungen in Holzzucker auf 365 g feuchte Hefe vermehrt und mit dieser Hefe eine Züchtung in Xylose (Versuch 5) durchgeführt. Die Hefe vermehrte sich ebenfalls, doch wurden die

[1] Die Hefe stammte aus der Versuchsanlage der Wirtschaftlichen Vereinigung der Deutschen Hefeindustrie, Abteilung Tornesch.

Tabelle II. Einz...

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Versuch Nr.	Angaben zur Züchtung: Besondere Bemerkung	Züchtungsdauer Std.	Vorgeschichte der Stellhefe	Angew. Zucker: Xylose g	Angew. Zucker: Xylosedifferenz g	Xylosevergärungsgrad	Menge und Zusammensetzung der Stellhefetrockensubstanz: Trockensubstanz g	Rohprotein %	Rohprotein g	Asche %
1	—	$13^1/_2$	Chloridhaltiger Holzzucker	18,47	17,81	96,5	1,78	50,0	0,89	11,34
2	Xylose „*Schering*“	$11^1/_2$	Dasselbe	20,08	18,16	90,4	1,76	54,6	0,96	9,61
3	—	13	Normaler Holzzucker	18,55	17,87	96,3	1,76	53,9	0,95	9,51
4	—	14	Holzzucker-Betriebshefe	18,22	14,30	78,5	1,78	52,4	0,93	12,25
5	—	13	Sammlung Holzzucker	18,07	16,19	89,6	1,63	48,0	0,78	9,41
6	—	13	Sammlung Melasse	22,40	14,67	65,5	1,55	60,3	0,94	9,44
7	—	13	Erntehefe von Versuch Nr. 6	13,22	12,68	95,8	1,13	53,4	0,60	8,42
8	—	13	Glucose-Xylose	18,38	17,67	96,1	1,68	56,8	0,95	9,48
9	Zusatz von Tantalchlorid	13	Erntehefe von Versuch Nr. 6	13,22	12,75	96,4	1,13	53,4	0,60	8,42
10	—	13	Xylose	18,56	17,85	96,1	1,90	33,9	0,64	6,18
11	Zusatz von Malzkeimauszug	13	Xylose	18,32	17,53	95,7	1,90	33,9	0,64	6,18
12	Anwendung der doppelten Nährsalz- und Stickstoffmenge	13	Xylose	18,42	17,61	95,6	1,74	39,1	0,68	6,85
13	Anwendung von Glucose* statt Xylose	14	Holzzucker	20,00	20,00	100,0	1,74	61,3	1,07	8,83
14	—	13	Isolierung der großen runden Zelle	23,50	22,74	96,8	1,70	52,0	0,88	9,83
15	—	13	Erntehefe von Versuch Nr. 14	8,80	7,43	84,4	0,90	43,8	0,39	7,20

* Bei diesem Versuch ist in allen Spalten Glucose statt Xylose zu lesen.

Einrichtungen in Xylose.

11	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
	Menge und Zusammensetzung der Erntehefetrockensubstanz				Zuwachs an				Ausbeuten, bezogen auf					
									Xylose			Xylosedifferenz		
Asche %	Rohprotein %	Rohprotein g	Asche %	Asche g	Hefetrockensubstanz g	Rohprotein g	Asche g	Organische Substanz g	Hefetrockensubstanz %	Rohprotein %	Organische Substanz %	Hefetrockensubstanz %	Rohprotein %	Organische Substanz %
11,34	44,7	4,63	7,92	0,823	8,59	3,74	0,62	7,97	46,5	20,3	43,2	48,2	21,0	44,7
9,61	33,7	3,70	5,95	0,654	9,22	2,74	0,49	8,73	46,0	13,6	43,5	50,8	15,1	48,0
9,51	46,4	4,67	7,98	0,803	8,30	3,72	0,64	7,66	44,8	20,0	41,3	46,5	20,8	42,9
12,25	42,3	3,10	4,10	0,301	5,56	2,17	0,08	5,48	30,5	11,9	30,0	38,9	15,2	38,3
9,41	51,9	4,20	8,24	0,668	6,48	3,42	0,52	5,96	35,8	18,9	33,0	40,0	21,1	36,8
9,44	52,0	2,83	7,56	0,411	3,89	1,89	0,27	3,62	17,4	8,4	16,1	26,5	12,9	24,7
8,42	63,0	3,97	8,93	0,562	5,17	3,37	0,47	4,70	39,1	25,5	35,5	40,8	26,6	37,0
9,48	50,3	4,82	7,92	0,759	7,90	3,87	0,60	7,30	43,0	21,1	39,7	44,7	21,9	41,3
8,42	62,2	4,04	8,70	0,564	5,36	3,44	0,47	4,89	40,5	26,0	37,0	42,1	27,0	38,3
6,18	38,5	4,09	6,44	0,685	8,72	3,45	0,57	8,15	47,0	18,6	43,9	48,9	19,3	45,6
6,18	40,6	4,44	6,95	0,760	9,02	3,80	0,64	8,38	49,3	20,8	45,7	51,5	21,7	47,8
6,85	43,4	4,40	7,54	0,765	8,40	3,72	0,65	7,75	45,6	20,2	42,0	47,7	21,1	44,0
8,83	56,2	6,15	7,90	0,864	9,19	5,08	0,71	8,48	46,0	25,4	42,4	46,0	25,4	42,4
9,83	39,5	3,80	6,83	0,657	7,93	2,92	0,49	7,44	33,8	12,4	31,6	34,8	12,8	32,7
7,20	42,7	1,85	5,66	0,245	3,43	1,46	0,18	3,25	39,0	16,6	36,9	46,1	19,6	43,8

hohen Ausbeuten nicht ganz erreicht. Um nun jede Berührung mit Holzzucker auszuschalten, wurde die von der Agarkultur in Melasse abgeimpfte Torula utilis in zwei Führungen in Melasse vorgezüchtet. Die Züchtung dieser Hefe (normale Torula utilis, aber etwas langgestreckte Zellen) in Xylose (Versuch 6) verlief zwar auch positiv, jedoch wurden nur etwa zwei Drittel der angewandten Xylose umgesetzt und die auf die verschwundene Xylose bezogene Hefeausbeute erreichte nur etwa die Hälfte der üblichen Ausbeute. Die bei Versuch 6 geerntete Hefe wurde in Xylose weiter geführt (Versuch 7). Die dabei erzielte Ausbeute lag höher, hat allerdings die Norm noch nicht ganz erreicht. Eine andere in Xylose-Glucosemischung geführte Torula utilis gab bei Züchtung in reiner Xylose sofort eine normale Ausbeute (Versuch 8). Bei der Züchtung von Torula utilis in Xylose verschiedener Herkunft oder bei Anwendung von Stellhefen verschiedener Herführung und Vorgeschichte ließen sich keine Anhaltspunkte für das positive Verhalten der Torula utilis auffinden. Sowohl drei verschiedene aus Holzzucker hergeführte als auch aus der Sammlung abgeimpfte und in Holzzucker bzw. Melasse geführte Hefen ließen sich in Xylose im Lüftungsverfahren züchten. Die Holzzuckerbetriebshefe und die Hefen der Sammlung gaben dabei allerdings Ausbeuten, die unter der Norm lagen. Es kann somit das jetzt festgestellte Vermögen, Xylose zu verwerten, nicht auf eine allmähliche Anpassung der Torulahefe an die xylosehaltige Nährlösung, in diesem Falle Holzzucker, zurückgeführt werden. Auch der Einfluß katalytisch oder stimulierend wirkender Stoffe im Holzzucker ist auf Grund der Versuche abzulehnen, wenngleich zwischen der in Holzzucker und der in Melasse aus der Sammlung hergeführten Hefe in bezug auf die Ausbeute ein Unterschied besteht. Vorausgesetzt, daß die Fähigkeit Xylose anzugreifen, überhaupt vorhanden ist, ist eine Angewöhnung der Hefe nützlich und notwendig, wie die zweite Xyloseführung der in Melasse vorgezüchteten Hefe zeigt. Die Ursache des positiven Verhaltens der Torula utilis konnte nicht ermittelt werden und muß in noch unbekannten Einflüssen gesucht werden.

Einige weitere Versuche dienten der Feststellung des Einflusses verschiedener Maßnahmen bei der Züchtung. Da eine Hefe, die sich Xylose gegenüber indifferent verhielt, nicht zur Verfügung stand, beschränkten sich die Folgerungen aus den Versuchen auf die erzielte Ausbeute und sonstige etwaige Besonderheiten im Züchtungsverlauf. Ausgehend von der Tatsache, daß die Salzsäuregewinnung beim *Bergius-Rheinau*-Verfahren in Tantalöfen erfolgt, wurde untersucht, ob Spuren von Tantal die Xyloseverzüchtung irgendwie katalytisch beeinflussen. Parallel zu Versuch 7 wurde eine Züchtung (Versuch 9) mit Zusatz von Tantalchlorid (25 mg auf die Gesamtmenge) ausgeführt. Bei beiden Versuchen wurde dieselbe Ausbeute erhalten. Die aber noch steigerungs-

fähige Ausbeute wurde durch Tantalzusatz nicht erhöht. Weiterhin wurde untersucht, ob die Gabe von Malzkeimauszug als Biosträger die Ausbeute bei der Züchtung von Torula utilis in Xylose erhöht. Es wurden parallel zwei Versuche durchgeführt, einer ohne (Versuch 10), einer mit Zusatz von Malzkeimauszug (insgesamt 100 ccm; Konzentration 1 : 25) (Versuch 11). Der Auszug wurde im Laufe der Züchtung nach und nach zugegeben. Als Stellhefe diente eine bereits mehrmals in Xylose geführte Torula utilis. Die Ausbeuten lagen bei der Züchtung mit Malzkeimauszug etwas höher. Dies rührt vermutlich von der Ausnutzung der Kohlenhydrate des Auszugs her. Bei der Xyloseverzüchtung ist kein Zusatz von Malzkeimauszug erforderlich. Eine Gabe von überschüssigem Stickstoff und Nährsalzen — die doppelte Menge wie normal — war ohne Wirkung auf die Ausbeute (Versuch 12). Übrigens sind Nährsalze und Stickstoff schon beim normalen Züchtungsansatz im Überschuß vorhanden. Der Hauptzweck des Versuchs, den Eiweißgehalt der Erntehefe durch Anwendung eines mehrfachen Stickstoffüberschusses zu erhöhen, mißlang. Auf diesen Punkt wird später noch näher eingegangen.

Bei Verwendung der Standardapparatur werden bei Züchtung von Torula utilis in Glucose Ausbeuten von 50 bis 52% Hefetrockensubstanz, bezogen auf Glucose, erhalten. Es ist bekannt, daß die Feinheit der Luftverteilung und die Höhe der Flüssigkeitsschicht der gelüfteten Nährlösung die Ausbeute beeinflußt (7). Die Flüssigkeitssäule ist bei Beendigung der Standardzüchtung etwa 1 m hoch. Beim Lüften in niedrigerer Flüssigkeitsschicht sinkt die Ausbeute. So wurde früher (8) bei mittelfeiner Belüftung und einer Flüssigkeitssäule von etwa 50 cm eine Hefetrockensubstanzausbeute von 46,7% erhalten. Um einen Vergleichsmaßstab für die mit der verwendeten Lüftungsapparatur (Luftverteilung: mittelfein; Flüssigkeitssäule etwa 12 cm) erzielten Hefeausbeuten aus Xylose zu erhalten, wurde gleichartig eine Glucosezüchtung mit Torula utilis bei normaler Lüftungsdauer (8 Stunden) ausgeführt (Versuch 13). Die verwendete Stellhefe war in Holzzucker geführt worden. Die Ausbeute an Hefetrockensubstanz betrug 46,0%. Praktisch sind dem die Ausbeuten aus Xylose gleich.

Im folgenden sind nun die besonderen Beobachtungen und die Ausbeuten bei den beschriebenen Versuchen kurz dargelegt.

Bei der mikroskopischen Kontrolle der Züchtungen wurde eine auffallende Beobachtung gemacht. Im Verlaufe der Züchtung traten nach etwa 5 bis 8 Stunden Lüftung kreisrunde Zellen auf. Die verwendete Stellhefe zeigte die normale ovale Zellform der Torula utilis und war ohne Infektion. Außer der Änderung der Zellform eines Teiles der Zellen — die übrigen hatten die typische ovale Form — war besonders die Größe eines Teiles der runden Zellen auffallend. Die Größe

dieser sogenannten großen runden Zellen betrug ein Mehrfaches der üblichen Zellgröße der Torula utilis, siehe Abb. 1.

Die Menge der kleinen und großen runden Zellen wechselte bei der Weiterführung derselben Hefe. Auszählungen am Ende der Gärung ergaben z. B. bei Versuch 2 und 10 35% große runde Zellen und bei Versuch 3 und 12 10% große runde Zellen. Die großen runden Zellen sproßten ebenfalls. Das Auftreten der runden Zellen war bei allen Züchtungen mit Ausnahme der Versuche 5 und 6 festzustellen. Bei diesen beiden Lüftungen, in denen Torula utilis aus der Sammlung in Holzzucker bzw. Melasse hergeführt zum ersten Male in reiner Xylose gezüchtet wurde, wurden keine runden Zellen, sondern nur wenige

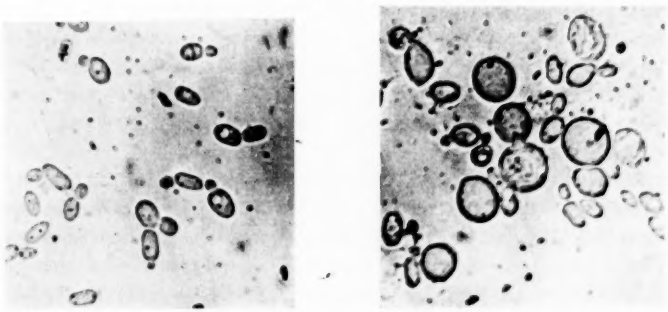


Abb. 1. Torula utilis (etwa 750fache Vergrößerung).
Normale Zellform. Große runde Zellen aus Xylose.

längliche Zellformen außer der normalen Torulaform beobachtet. Bei der Weiterführung der Erntehefe von Versuch 6 in den Versuchen 7 und 9 traten bereits wieder große runde Zellen auf. Bei Versuch 9 wurden außerdem sehr langgestreckte Zellformen und Mycelbildung, die als Infektion von Oidium lactis angesprochen wurde, beobachtet.

Um aufzuklären, ob es sich bei den großen kreisrunden Zellen wirklich um eine umweltbedingte Zellform der Torula utilis handelt, mußte eine Einzellkultur angelegt werden. Von der Erntehefe des Versuchs 10 wurden mittels Tröpfchenkultur große runde Zellen isoliert. Ausgehend von den großen runden Zellen wurde wieder die normale Torulaform erhalten. Die in Melassenährlösung angewachsene Hefe wurde dann durch Lüftung in zwei Führungen in Holzzucker vermehrt. Bei der ersten Führung bildeten sich im Laufe der Züchtung außer der vorwiegenden Torulaform auch langgestreckte schmale Zellen. Zwischendurch wurde richtiges Mycel beobachtet. Am Ende der Lüftung waren die Zellen fast alle torulaförmig und es fanden sich nur sehr wenig runde Zellen mittlerer Größe vor. Bei der zweiten Führung in Holzzucker

zeigte sich im Mikroskop dasselbe Bild. Es traten wieder längliche Zellen, schlauchartige Gebilde und Zellkomplexe auf. Am Ende der Züchtung waren wieder fast nur torulaförmige Zellen vorhanden. Der physiologische Zustand der Zellen war gut und die Sprossung bei beiden Führungen lebhaft. Die Erntehefe wurde nun zweimal in Xylose wie üblich geführt (Versuch 14 und 15). Bei der ersten Xyloseführung (14) war die Ausbeute sehr schlecht; die Hefe sproßte kaum. Während der Lüftung waren runde, ovale und längliche Zellen zu beobachten und gegen Mitte der Züchtung traten auch große runde Zellen auf. Bei der zweiten Führung in Xylose war die Ausbeute besser. Das Sproßbild war beinahe gut zu nennen. Außer der typischen Torulaform waren kleine und große runde Zellen vorhanden.

Die runden und großen runden Zellen gehören tatsächlich Torula utilis an, und zwar scheint sich die große runde kugelige Zellform bei der Führung in Xylose auszubilden. Bisher war diese Zellform für Torula utilis unbekannt (und ist nur für Torula pulcherrima beschrieben). Ob es sich bei dem kurzen nur wenige Stunden währenden Auftreten der langgestreckten Zell- und Mycelformen um Infektionen handelte, ist nicht erwiesen. Nach Beendigung der Lüftung wurde die Hefe immer frei von Infektion befunden. Es ist übrigens bei Torula utilis festgestellt worden, daß die Zellform mit der Schnelligkeit des Wachstums zusammenhängt. Schnelles Wachstum bedingt längliche, langsames Wachstum rundliche Zellen (9).

Der physiologische Zustand der Hefezellen war im allgemeinen bei den Xylosezüchtungen sehr gut zu nennen, obwohl manchmal die mikroskopische Untersuchung gegen Ende der Lüftung eine leichte Körnigkeit der Zellen erkennen ließ. Das Sproßbild spiegelte den Gärverlauf wieder. Die Versuche mit schlechter Ausbeute zeigten auch entsprechend schlechte Sprossung.

Zur Züchtung selbst ist zu sagen, daß die Gärzeit bis auf 13 bis 14 Stunden ausgedehnt wurde. Eine Verlängerung war nötig durch die geringere Vermehrungsgeschwindigkeit der Torulahefe in Xylose und dann wegen der Unterbrechung der Lüftungen. Der Zulauf war nach 8 bis 10 Stunden Züchtungsdauer, 1 Stunde Angärzeit eingerechnet, beendet. Das p_H schwankte während der Gärung in den üblichen Grenzen. Das Anfangs-p_H betrug etwa 6,0; während der Züchtung wurde das p_H bei etwa 3,0 bis 5,0 gehalten. Die Xylosekonzentration bei der Züchtung, d. h. die angewandte Xylose, bezogen auf das Gesamtvolumen am Ende der Gärung, betrug etwa 1,4%.

Die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz, auf die Xylosedifferenz bezogen, betrugen bei den besten Versuchen bis etwa 51% und lagen normalerweise im Durchschnitt zwischen etwa 45 und 48%. Der

Vergleichsversuch mit Glucose ergab eine Ausbeute von 46%. Die Ausbeuten aus Xylose liegen auf etwa gleicher Höhe wie die aus Glucose.

Auffallend ist der trotz des angewandten Stickstoffüberschusses meist sehr niedrige Rohproteingehalt der Erntehefen. Während der Rohproteingehalt bei Glucosezüchtungen immer zwischen 50 und 60% beträgt, lag er bei Xylose als Kohlenstoffquelle zwischen 40 und 50% und sogar unter 40%. Deshalb sind auch die auf Xylosedifferenz bezogenen Rohproteinausbeuten sehr niedrig und liegen im Mittel bei etwa 21%. Auch bei dem mit mehrfachem Stickstoffüberschuß angestellten Versuch 12 wies die Erntehefe einen niedrigen Rohproteingehalt auf. Die Glucosezüchtung 13, die mit in Holzzucker geführter Hefe angestellt wurde, hatte einen hohen Rohproteingehalt. Nur bei den Versuchen mit Torula utilis aus der Sammlung betrug der Rohproteingehalt über 50% und auch bei Versuch 8 erreichte er 50%. Bei der zweiten Führung der in Melasse vorgezüchteten Hefe aus der Sammlung (Versuch 7 und 9) wurden auffallend hohe Rohproteingehalte von über 60% gefunden.

Der Aschegehalt der Erntehefen ist verhältnismäßig gering. Er erniedrigt sich allgemein mit fallendem Rohproteingehalt. Es hängt dies mit der Verknüpfung der Salze und Aschebestandteile mit Proteinsubstanzen (Nukleoproteide) zusammen. Ungewöhnlich niedrig ist der Aschegehalt der Erntehefe von Versuch 4.

Die Ausbeuten an aschefreier Hefetrockensubstanz oder organischer Substanz, bezogen auf die Xylosedifferenz, bewegen sich in den besten Fällen um 44 bis 48% und entsprechen den bei Standardzüchtungen mit Glucose erhaltenen Werten (4).

Der Xylosevergärungsgrad liegt allgemein bei 95 bis 97%. Es bleiben immer 3 bis 5% der angewandten Xylose nach Beendigung der Gärung übrig. Deshalb sind auch nur die auf Xylosedifferenz bezogenen Ausbeuten maßgebend. Die Xylosebestimmung in sehr verdünnten Lösungen ist mit einer gewissen Ungenauigkeit verbunden, auf die bereits früher hingewiesen wurde (10).

Dauerzüchtung in Xylose.

Die nachfolgenden Versuche dienten der Prüfung, ob bei Züchtung von Torula utilis in Xylose ebenso wie in Glucose eine Dauerzüchtung mit nur anorganischen Nährsalzen möglich ist. Es wurde eine Dauerzüchtung mit zehn Führungen durchgeführt. Als Ausgangshefe diente die auch bei Versuch 1 angewandte in Holzzucker geführte Torula utilis. Für die weiteren Führungen (Versuche 17 bis 25) kam jeweils die beim vorangegangenen Versuch geerntete Hefe als Stellhefe zur Anwendung. Die beiden letzten Züchtungen (24 und 25) wurden in der

Standardapparatur durchgeführt und dienten noch anderen Fragestellungen.

Die Züchtungen erfolgten wie üblich bei schwach saurer Reaktion und einem p_H von 3,0 bis 5,5. Die Dauer der Lüftungen betrug im Mittel 13 Stunden. Die Gärungen wurden mit Ausnahme der Standardzüchtungen einmal unterbrochen. Der Zulauf dauerte — 1 Stunde Angärung mit eingerechnet — 9 bis 10 Stunden. Die Xylosekonzentration betrug bei den Züchtungen 1,4%, nur bei den Standardzüchtungen 1,0%. Die Ergebnisse sind in der Tabelle III zusammengefaßt. Die anorganische Dauerzüchtung von Torula utilis in Xylose ist möglich.

Der physiologische Zustand der Zellen war durchweg sehr gut. Bei einigen Züchtungen trat gegen Ende der Lüftung teilweise Körnigkeit der Zellen ein. Das Sproßbild der Hefe war im Vergleich zu Glucosezüchtungen schlechter. Die Vermehrungsgeschwindigkeit in Xylose ist eine geringere und wirkt sich in der längeren Lüftungsdauer aus.

Es war auch hier, wie schon bei den Einzelzüchtungen festgestellt wurde, das Auftreten runder Zellformen und vor allem der großen runden Zellform bemerkenswert. Bei der ersten Führung (Versuch 16) traten gegen Ende der Züchtung erstmals große runde Zellen auf. Wie die Auszählung der großen runden Zellen am Ende der Lüftung zeigt, ist die Zahl derselben wechselnd. Zuerst war von Züchtung zu Züchtung ein Anwachsen der großen runden Zellen bis 60% und dann wieder ein Abfall bis auf wenige Prozent festzustellen. Abgesehen von den runden Zellen hatten die übrigen Zellen das normale Aussehen der Torula utilis. Die großen runden Zellen waren im mikroskopischen Bild zum Teil körnig; sie sproßten jedoch. Es ist weiter auffallend, daß bei der achten Führung (Versuch 23), als der Anteil der großen runden Zellen bereits sehr zurückgegangen war, schlauchartige Zellen auftraten, die als Oidiumhyphen angesprochen wurden. Bei den anschließenden Führungen (24 und 25) vermehrte sich der Anteil des Mycels bzw. der schlauchartigen Zellen und der Anteil der runden Zellen sank weiter. Die morphologischen Veränderungen sind an unserem Institut Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die einzelnen Führungen der Dauerzüchtungen wurden teilweise in größeren Zeitabständen ausgeführt. Es war dies ohne nennenswerten Einfluß. Die Stellhefe für die zehnte Führung war sogar 37 Tage im Eisschrank aufbewahrt worden. Vielleicht steht die verhältnismäßig niedrige Hefeausbeute damit in Zusammenhang.

Die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz, bezogen auf Xylose bzw. Xylosedifferenz, bewegen sich auf etwa gleicher Höhe und betragen, auf Xylosedifferenz bezogen, etwa 46 bis 49%. Die höhere Ausbeute bei der neunten Führung (Versuch 24) ist in der Standardapparatur begründet. Die niedrigere Ausbeute der zehnten Führung (Versuch 25)

Tabelle

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Versuch	Angaben zur Züchtung			Angew. Zucker			Menge und Zusammensetzung der Stellhefetrockensubstanz			
	Zwischenruhe der Stellhefe	Züchtungsdauer	Anteil der großen runden Zellen in der Erntehefe	Xylose	Xylosedifferenz	Xylosevergärungsgrad	Trockensubstanz	Rohprotein		Asch
								%	g	%
Nr.	Tage	Std.	%	g	g		g			
16	—	12½	20	18,18	17,40	95,7	1,76	54,6	0,96	9,61
17	16	15	30	18,59	15,45	83,2	1,64	39,4	0,65	8,01
18	5	13	60	18,43	17,60	95,5	1,97	34,3	0,68	5,78
19	3	13	35	18,56	17,85	96,2	1,90	33,9	0,64	6,18
20	2	13½	48	18,45	17,69	95,9	1,75	38,5	0,67	6,44
21	3	12	24	18,60	17,93	96,4	1,73	42,0	0,73	7,34
22	6	13	10	18,42	17,61	95,6	1,74	39,1	0,68	6,85
23	2	13	6	18,42	17,70	96,1	1,78	45,6	0,81	8,53
24	14	12	—	32,70	31,43	96,2	2,98	46,3	1,38	7,65
25	37	12	—	32,40	31,16	96,2	2,68	54,6	1,46	9,30

ist, wie erwähnt, auf das lange Aufbewahren der Stellhefe zurückzuführen.

Die Xylose wurde immer gleichmäßig verwertet. Der Xylosevergärungsgrad betrug durchweg 95 bis 96%. 4 bis 5% der angewandten Xylose blieben, wie auch bei den Einzelversuchen, unausgenutzt. Bei zu geringer Xylosekonzentration vermag die Hefe Xylose nicht mehr anzugreifen.

Auffallend ist wieder der niedrige Eiweißgehalt (34 bis 43%) der Erntehefen mit Ausnahme der letzten drei Führungen. Wahrscheinlich besteht ein Zusammenhang zwischen dem Rohproteingehalt und dem Anteil der großen runden Zellen in der Erntehefe. Es ist möglich, daß in den großen Zellen vorzugsweise eine Anreicherung an Kohlenhydraten oder auch Fetten stattfindet. Bei den Versuchen 23, 24 und 25, die nur mehr einen sehr geringen Anteil großer runder Zellen aufweisen, ist der Rohproteingehalt der Erntehefen beinahe normal.

Der Aschegehalt der Erntehefen ist niedrig (5,7 bis 7,8%) und steht, wie schon bei den Einzelzüchtungen erwähnt wurde, mit dem niedrigen Rohproteingehalt in Zusammenhang. Die Ausbeuten an organischer Substanz, auf Xylosedifferenz bezogen, liegen durchschnittlich zwischen 44 bis 46%, im Falle des Standardversuchs 24 sogar bei 50% und damit über den für Glucose erhaltenen Werten (4).

Bei den Dauerzüchtungen ergab die Analyse ein und derselben Hefe, d. h. der Stellhefe im Vergleich zur Analyse der Erntehefe des vorhergehenden Versuchs, meist einen etwas höheren Rohprotein- und Aschegehalt; dieser Unterschied ist auf Veratmung von Kohlenhydraten der Zellsubstanz während der Zwischenruhe zurückzuführen.

uerzüchtung.

14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
e und Erntehefe	Zusammensetzung trockensubstanz			Zuwachs an				Ausbeute, bezogen auf					
								Xylose			Xylosedifferenz		
Rohprotein		Asche		Hefe-trocken-substanz	Rohprotein	Asche	Organische Substanz	Hefe-trocken-substanz	Roh-protein	Orga-nische Substanz	Hefe-trocken-substanz	Roh-protein	Orga-nische Substanz
%	g	%	g	g	g	g	g	%	%	%	%	%	%
37,9	3,96	7,60	0,794	8,67	3,00	0,63	8,04	47,8	16,5	44,3	49,8	17,2	46,2
34,1	2,92	5,67	0,485	6,92	2,27	0,35	6,57	37,2	12,2	35,4	44,8	14,7	42,5
33,9	3,58	6,18	0,652	8,58	2,90	0,54	8,04	46,5	15,7	43,6	48,8	16,5	45,7
38,5	4,09	6,44	0,684	8,72	3,45	0,57	8,15	47,0	18,6	43,9	48,9	19,3	45,7
41,4	4,19	6,95	0,703	8,36	3,52	0,59	7,77	45,3	19,1	42,1	47,3	19,9	44,0
38,3	4,04	6,49	0,685	8,82	3,31	0,56	8,26	47,5	17,8	44,4	49,2	18,5	46,1
43,4	4,40	7,54	0,765	8,40	3,72	0,65	7,75	45,6	20,2	42,1	47,7	21,1	44,0
47,9	4,77	7,33	0,730	8,18	3,96	0,58	7,60	44,4	21,5	41,3	46,2	22,4	43,0
52,3	10,45	7,67	1,534	17,02	9,07	1,31	15,71	52,1	27,7	48,1	54,1	28,8	50,0
51,6	8,82	7,77	1,328	14,41	7,36	1,08	13,33	44,5	22,7	41,1	46,3	23,6	42,8

Allgemein ist zu bemerken, daß bei den Xylosezüchtungen, auch bei den Einzelzüchtungen, die Trockensubstanzgehalte der abgenutschten Erntehefe mit 25 bis 27% höher waren als bei den in Glucose gezüchteten Hefen (22 bis 24%). Außerdem zeigte der über der gelüfteten Nährlösung befindliche Schaum bei Xylosezüchtungen keine rötliche Färbung im Gegensatz zu Glucosezüchtungen, bei denen diese Erscheinung immer beobachtet wurde.

Einzelzüchtungen in Glucose-Xylosemischungen.

Nachdem die Ausnutzung der Xylose durch Torula utilis bewiesen war, wurde die Verwertung der Xylose in Glucose-Xylosemischungen erneut untersucht. Früher konnte in Hexosen-Pentosengemischen der Beweis für eine Xyloseverwertung trotz manchmal vorhandener Anzeichen nicht erbracht werden. Eine damals ausgeführte Standardzüchtung (Versuch 26) mit Kohlenstoffbilanz ist deshalb den neueren Versuchen vorangestellt. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle IV zusammengefaßt.

Die bei Versuch 26 erhaltene Hefeausbeute, bezogen auf die angewandte Glucose, lag um einen ganz geringen Betrag über den Standardausbeuten für Glucose, die allgemein zwischen 50 bis 52% und im Höchstfalle bei 52,5% lagen (4). Ein Teil der Xylose war während der Lüftung verschwunden. Bezieht man die Hefeausbeute auf Glucose plus Xylosedifferenz, dann entspricht sie ebenfalls den Standardwerten für Glucose, liegt aber an der unteren Grenze. Auf Grund dieses Versuchs ist eine teilweise Ausnutzung der Xylose wahrscheinlich, doch ist die Auswirkung zu gering, um daraus eindeutig auf eine Xylosever-

Tabelle IV. Einzelzüchtung Gluc

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
			Angewandter Zucker					Menge und Zusammensetzu der Stellhefetrockensubsta				ge und Ernteh
									Rohprotein		As	Rohp
Versuch Nr	Züchtungsdauer Std.	Xylose-konzentration *	Xylose-menge g	Xylose-differenz g	Xylose-vergärungs-grad	Glucose g	Glucose + Xylose-differenz	Trocken-substanz g	%	g	%	%
26	8	0,25	17,50	3,42	19,5	52,50	55.92	4,93	56,9	2,80	7,20	55,9
27	8	0,30	7,67	5,34	69,5	26,20	31,54	2,75	55,3	1,52	9,77	56,7
28	11	0,32	8,40	8,15	97,1	26,20	34,35	2,77	53,8	1,49	11,27	54,5
29	$10^1/_2$	0,29	7,41	6,37	85,9	25,90	32,27	2,56	48,0	1,23	9,41	56,8
30	14	0,12	2,46	1,84	74,8	20,00	21,84	1,74	46,4	0,81	7,98	47,3

* D. h. die angewandte Xylosemenge bezogen auf das Volumen der Nährlösung am Ende der Z

wertung schließen zu können. Zum gleichen Ergebnis führte auch die Kohlenstoffbilanz (s. Tabelle V). Die Summe des Kohlenstoffs des Hefezuwachses und des Kohlenstoffs der anfallenden Kohlensäure ist beinahe gleich der mit der Glucose angewandten Kohlenstoffmenge. Die Menge des in der vergorenen Lösung einschließlich Alkoholwaschwasser verbliebenen Kohlenstoffs ist geringer als die mit der angewandten Xylose eingeführte Kohlenstoffmenge. Die Differenz liegt aber innerhalb des Bilanzfehlers, der insgesamt ein Minus von 0,62 g Kohlenstoff, entsprechend 2,0%, aufweist. Der Fehler in der Stickstoffbilanz betrug vergleichsweise minus 1,0%. In der vergorenen Lösung wurde kein Alkohol gefunden und auch das Alkoholwaschwasser hatte nur einen Gesamtkohlenstoffgehalt von 0,05 g.

Eindeutige Ergebnisse lieferten die nachfolgend beschriebenen Versuche. Die Standardzüchtungen 27, 28 und 29 ergaben, auf angewandte Glucose bezogen, eine übernormale Ausbeute an Hefetrockensubstanz, organischer Substanz und Rohprotein. Auf Glucose plus Xylosedifferenz bezogen, liegen die Ausbeuten allerdings unter der Norm. Es ist Xylose zum Hefeaufbau verwendet worden, jedoch wurde nicht die gesamte während der Züchtung verschwundene Xylosemenge zur Zellsubstanzbildung ausgenutzt. Bei Versuch 27 wurde gemäß den Standardbedingungen 8 Stunden gelüftet, bei Versuch 28 dagegen 11 Stunden. Die Xyloseausnutzung ist bereits bei achtstündiger Lüftungsdauer eindeutig festzustellen. Das Festhalten an der in den Standardbedingungen vorgeschriebenen Züchtungsdauer kann keinesfalls die Ursache der früheren negativen Befunde sein. Bei Versuch 27 verschwanden etwa zwei Drittel der angewandten Xylose, bei Versuch 28 ist der Xylosevergärungsgrad sehr hoch und die Hefeausbeute, auf Glucose plus Xylosedifferenz bezogen, fast normal. Die längere Lüftungs-

Glucose-Xylosemischungen.

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
ge und Erntehefe	Zusammensetzung trockensubstanz			Zuwachs an				Ausbeuten, bezogen auf					
Rohprotein		Asche						Glucose			Glucose + Xylosediff.		
%	g	%	g	Hefetrockensubstanz g	Rohprotein g	Asche g	Organische Substanz g	Hefetrockensubstanz %	Rohprotein %	Organische Substanz %	Hefetrockensubstanz %	Rohprotein %	Organische Substanz %
55,9	18,30	10,20	3,340	27,82	15,50	2,99	24,83	53,0	29,5	47,3	49,8	27,7	44,5
56,7	9,90	9,48	1,654	14,70	8,38	1,39	13,31	56,1	32,0	50,8	46,6	26,6	42,2
54,5	10,63	10,22	1,995	16,74	9,14	1,68	15,06	63,9	34,9	57,5	48,8	26,6	43,8
56,8	9,59	9,72	1,642	14,33	8,36	1,40	12,93	55,4	32,3	49,9	44,4	25,9	40,0
47,3	5,85	6,97	0,864	10,65	5,04	0,73	9,92	53,3	25,2	49,7	48,8	23,1	45,4

dauer wirkte sich bei der geringen Vermehrungsgeschwindigkeit der Torula utilis in Xylose deutlich aus. Die Versuche 26 bis 28 waren mit Torula utilis aus Holzzucker angestellt worden. Der mit Torula utilis aus der Sammlung (in Holzzucker hergeführt) mit verlängerter Lüftungsdauer durchgeführte Standardversuch 29 erbrachte, auf Glucose plus Xylosedifferenz bezogen, eine schlechte Hefeausbeute. Der Xyloseschwund betrug 86%. Der mit Holzzucker durchgeführte Versuch 30 war mit Hefe aus Xylose angestellt worden. Die Hefeausbeute, bezogen auf Glucose, überschritt die Norm, die auf Glucose plus Xylosedifferenz bezogene Hefeausbeute lag etwas darunter.

Tabelle V.

Verteilung des Kohlenstoffs vor der Züchtung			Verteilung des Kohlenstoffs nach der Züchtung		
	g Kohlenstoff	in % der Gesamtmenge		g Kohlenstoff	in % der Gesamtmenge
Glucose	21,44	69,0	Kohlensäure ...	8,73	48,8
Xylose	7,26	23,4	Hefeernte	14,87	28,7
Stellhefe	2,35	7,6	Nährlösung einschließlich Alkoholwaschwasser	6,83	22,5
	31,05	100,0		30,43	100,0

Kohlenstoff im Hefezuwachs: 12,52 g
„ in der Kohlensäure: 8,73 g
Summe: 21,25 g

Die Rohprotein- und Aschegehalte der Erntehefen sind normal, nur bei Versuch 30 etwas niedriger. Der physiologische Zustand und das Sproßbild der Hefe war bei allen Versuchen als gut zu bezeichnen.

Im allgemeinen wurde nur die normale typische Zellform der Torula utilis beobachtet, bei den Versuchen 27 und 28 auch einige Evolutionsformen und bei den Versuchen 28 und 30 einzelne kleine runde Zellen. Große kreisrunde Zellen traten nicht auf. Die Erntehefen der genannten Züchtungen waren frei von Infektion. Der Trockensubstanzgehalt der abgenutschten Erntehefe betrug 22 bis 24%, wie er bei Glucosehefen üblich ist.

Die p_H-Werte lagen bei Beginn der Züchtung zwischen etwa 5,5 bis 6,0 und bewegten sich während der Lüftung zwischen etwa 3,0 bis 5,1. Der Zulauf dauerte bei den Standardversuchen 7 bis 8 Stunden, bei Versuch 30 10 Stunden. Die Xylosekonzentration war gering, etwa 0,3% und im letzten Falle sogar nur 0,1%.

Die vergorene Nährlösung von Versuch 27 wurde erneut mit Stellhefe versetzt und 13 Stunden gelüftet. Am Ende war die Xylose vollständig verschwunden und ein entsprechender Hefezuwachs eingetreten. Während der Züchtung traten kleine und große runde Zellen auf.

Abgesehen von der geringeren Vermehrungsgeschwindigkeit der Torula utilis in Xylose überhaupt, ist die Xyloseausnutzung in gemischten Substraten nicht so vollkommen wie in Xylose allein. Die verhältnismäßig geringe Xylosekonzentration mag dabei von Einfluß sein. Vermutlich wird in Kohlenhydratgemischen zunächst die Glucose verwertet und dann erfolgt eine Umstellung der Hefe auf den Angriff von Xylose.

Züchtungen in Galaktose und Mannose.

Zu den in der letzten Mitteilung beschriebenen Ergebnissen bei der Züchtung von Torula utilis in Mannose und Galaktose sind noch ergänzende Angaben zu machen.

Die Lüftungsdauer bei diesen Versuchen betrug 15 bis 17 Stunden. Als Stellhefe diente sowohl bei den Züchtungen in Galaktose als auch in Mannose eine mehrmals in Holzzucker geführte Torula utilis. Die Dauerzüchtung in Galaktose ergab, von den beiden ersten Führungen abgesehen, bei denen noch eine gewisse Anpassung erfolgte, normale Ausbeuten von etwa 46% Hefetrockensubstanz, auf die angewandte Galaktose bezogen. Bei der Dauerzüchtung in Mannose liegt die höchste Hefeausbeute um 40%. Der angewandte Zucker ist bei Galaktose und Mannose bis auf Spuren während der Züchtung verschwunden. Der Rohproteingehalt der Galaktosehefen ist niedrig und liegt bei 35 bis 40%, während die Mannosehefen normalen Rohproteingehalt aufweisen. Die Aschegehalte verhalten sich wie die Rohproteingehalte.

Ausgehend von normaler Torula utilis bildeten sich in Galaktose bei der zweiten Führung allmählich runde Zellen, darunter große runde Zellen aus. Daneben wurden schlauchartige Zellen, die aus normalen

Zellen sproßten, und Bildung von Mycel mit langen schmalen Hyphen beobachtet. Die Erntehefen waren infektionsfrei. Bei den Mannosezüchtungen wurden normale torulaförmige Zellen vorgefunden.

Züchtungsversuche mit Torula utilis, aus der Sammlung, in Holzzucker hergeführt, verliefen bei Galaktose negativ. Es verschwand etwa ein Drittel des angewandten Zuckers, jedoch trat kein Hefezuwachs ein. Dieser Befund wird noch weiter verfolgt werden. Von *H. Fink* und *F. Just* (11) konnte aus Torula utilis, die in Holzzucker gezüchtet war, Dulcit isoliert werden, und es wurde die Entstehung dieses Zuckeralkohols aus Galaktose angenommen. Bei Mannose dagegen verlief die Züchtung glatt und es wurde eine Hefeausbeute um 40% erhalten. Der angewandte Zucker war vollständig verbraucht. Eine Änderung der normalen Zellform war nicht wahrzunehmen.

Mannose und Galaktose werden von Torula utilis ausgenutzt. Die Hefeausbeuten in Galaktose entsprechen etwa denen in Glucose und in Xylose; die in Mannose sind niedriger. Die Hefezüchtung in Galaktose weist gewisse Parallelen mit der Hefezüchtung in Xylose auf. Die Torula utilis vermag in diesen Nährmedien runde, besonders große runde Zellformen zu bilden, die Erntehefen haben verhältnismäßig niedrige Rohproteingehalte und auch bei Nichtausnutzung der gebotenen Kohlenhydrate zur Zellsubstanzbildung wird ein Zuckerschwund beobachtet.

Zusammenfassung.

Es gelang, Torula utilis in Xylose zu züchten. Die Ursache des gegenüber früheren Befunden nun positiven Verhaltens der Torula utilis gegenüber Xylose konnte nicht ermittelt werden und wird auf unbekannte Einflüsse zurückgeführt. Weder stimulierend wirkende Beimengungen in der Xylose oder im Holzzucker noch die verschiedene Herkunft und Vorgeschichte der Stellhefe oder allmähliche Anpassung der Torula utilis in xylosehaltigen Nährlösungen können auf Grund der durchgeführten Versuche als Ursache für das Verhalten der Torula utilis angegeben werden. Bei bereits vorhandener Fähigkeit Xylose zu verwerten, bedarf die Hefe zur Erreichung höchster Ausbeuten in manchen Fällen einer gewissen Angewöhnung. Die Vermehrungsgeschwindigkeit der Torula utilis in Xylose ist eine geringere als in Glucose.

Die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz sind aus Xylose ungefähr gleich denen aus Glucose. Die Rohproteinausbeuten sind aus Xylose niedriger als aus Glucose, da der Rohprotein- und dementsprechend der Aschegehalt der Xylosehefen durchschnittlich geringer sind als bei den Glucosehefen. Etwa 3 bis 5% der angewandten Xylose bleiben bei der Züchtung unausgenutzt.

Die anorganische Dauerzüchtung von Torula utilis in Xylose ist möglich. Es tritt kein Abfall in der Ausbeute ein und die Hefe bleibt frei von Infektion. Die Haltbarkeit der Xylosehefe ist gut.

Bei der Züchtung in Xylose tritt eine Veränderung der Zellform der Torula utilis ein. Ein Teil der Zellen bekommt eine runde Form, und besonders auffallend ist die Entstehung großer kreisrunder Zellen. Die großen runden Zellen sind eine umweltbedingte Zellform der Torula utilis, daneben wurden in geringerem Maße längliche und schlauchartige Zellformen beobachtet. Die großen runden Zellen stehen vielleicht in Zusammenhang mit dem niedrigen Rohproteingehalt der Xylosehefen.

Auch in Glucose-Xylosemischungen wird die Xylose durch Torula utilis verwertet. Die Xyloseausnutzung ist jedoch nicht immer vollkommen. Einem gewissen Xyloseschwund steht oft nicht der auf Grund der Ergebnisse in reiner Xylose zu fordernde Hefezuwachs gegenüber. Bei längerer Züchtungsdauer wird die Xylose besser ausgenutzt. Große runde Zellen treten in den Zuckergemischen nicht auf.

Galaktose und Mannose werden von Torula utilis ebenfalls zum Zellaufbau verwertet. Damit ist bewiesen, daß alle wesentlichen im Holz vorkommenden Kohlenhydrate von Torula utilis zur Zellsubstanzsynthese ausgenutzt werden können.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Züchtungsversuche bin ich Herrn Dipl.-Br.-Ing. *R. Illig* und für die Ausführung biologischer Untersuchungen Herrn Dipl.-Br.-Ing. *M. Glaubitz* zu besonderem Dank verpflichtet.

Literatur.

1) *R. Lechner*, diese Zeitschr. **300**, 204, 1939. — 2) *R. Lechner* u. *R. Illig*, ebenda **300**, 28, 1938. — 3) *H. Fink*, *R. Lechner* u. *J. Krebs*, ebenda **299**, 28, 1938. — 4) *H. Fink* u. *J. Krebs*, ebenda **299**, 1, 1938. — 5) *P. H. Prausnitz*, Chemiker-Ztg. **63**, 185, 1939. — 6) Dissertation *Hermann Münder*, Universität Berlin 1938 und *H. Fink* u. *H. Münder*, Vorratspflege u. Lebensmittelforschung, im Druck. — 7) *R. Lechner*, Holz als Roh- und Werkstoff **1**, 603, 1938. — 8) *H. Fink*, *R. Lechner* u. *E. Heinisch*, diese Zeitschr. **283**, 71, 1935. — 9) *W. Henneberg*, Handb. d. Gärungsbakteriologie, 2. Aufl., 2. Bd., S. 57, Berlin 1926, Verlag P. Parey. — 10) *R. Lechner* u. *R. Illig*, diese Zeitschr. **299**, 174, 1938. — 11) *H. Fink* u. *F. Just*, ebenda **296**, 306, 1938.

Cozymase als wasserstoff- und phosphatübertragendes Co-Ferment der Gärung.

Von

Paul Ohlmeyer.

(Aus dem Institut für Physiologie am Kaiser Wilhelm-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg.)

(Eingegangen am 5. April 1939.)

Im Mittelpunkt des anaeroben Kohlenhydratabbaues steht die Dehydrierung von Glycerinaldehydphosphorsäure zu Glycerinsäurephosphorsäure (Phosphoglycerinsäure). Der von ihr gelieferte Wasserstoff reduziert im Falle der alkoholischen Gärung Acetaldehyd zu Alkohol, im Falle der Milchsäuregärung Brenztraubensäure zu Milchsäure:

$$\text{Glycerinaldehydphosphorsäure} - H_2 \rightarrow \text{Phosphoglycerinsäure}, \quad (1)$$

$$\text{Acetaldehyd} + H_2 \rightarrow \text{Alkohol}, \quad (2a)$$

$$\text{Brenztraubensäure} + H_2 \rightarrow \text{Milchsäure}. \quad (2b)$$

Das Co-Ferment dieser Oxydoreduktion ist Cozymase, die den Wechsel $Cz \rightleftarrows CzH_2$ erleidet[1] und folgende Elementarreaktionen eingeht:

$$\text{Glycerinaldehydphosphorsäure} + Cz \rightarrow \text{Phosphoglycerinsäure} + CzH_2, \quad (3)$$

$$\text{Acetaldehyd (Brenztraubensäure)} + CzH_2 \rightarrow \text{Alkohol (Milchsäure)} + Cz. \quad (4)$$

Meyerhof hat entdeckt, daß die Dehydrierung von Glycerinaldehydphosphorsäure mit der Veresterung von anorganischem Phosphat energetisch gekoppelt ist. Dabei handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion: Die freie Energie der Dehydrierung von Glycerinaldehydphosphorsäure erzwingt die Phosphorylierung, die freie Energie der Dephosphorylierung erzwingt die Hydrierung von Phosphoglycerinsäure[2]. Als Phosphatakzeptor kann Adenosindiphosphorsäure dienen, die dabei zu Adenosintriphosphorsäure (Adenylpyrophosphorsäure) wird; dann heißt die gekoppelte Reaktion

$$\left.\begin{array}{l}\text{Glycerinaldehydphosphorsäure} + Cz \\ \qquad \rightleftarrows \text{Phosphoglycerinsäure} + CzH_2 \\ \text{Adenosindiphosphorsäure} + \text{Phosphorsäure} \\ \qquad \rightleftarrows \text{Adenosintriphosphorsäure}.\end{array}\right\} \quad (5)$$

[1] *O. Warburg* u. *W. Christian*, diese Zeitschr. **287**, 291, 1936. — [2] Vgl. *O. Meyerhof*, *P. Ohlmeyer* u. *W. Möhle*, diese Zeitschr. **297**, 90, 1938.

Adenosintriphosphorsäure kann Phosphat auf Zucker, unter Bildung von Hexosemonophosphat, umestern, und so kommt man von den Elementarreaktionen zu folgender Vorstellung von der gekoppelten Oxydation und Phosphorylierung im Gesamtverlauf der alkoholischen Gärung

$$\left.\begin{array}{l}\text{Glycerinaldehydphosphorsäure} \xrightarrow{\text{Cz}} \text{Phosphoglycerinsäure} \\ \text{Hexose} + \text{Phosphorsäure} \xrightarrow{\text{Adenosintriphs.}} \text{Hexosemonophosphorsäure.}\end{array}\right\} \quad (6)$$

Diese Vorstellung erscheint insofern problematisch, als den beiden Reaktionen ein gemeinsames Molekül fehlt; dieses wäre aber zu erwarten, da es sich ja um eine Energieübertragung handelt. Man kann es in einem Fermentprotein suchen; da jedoch bekannt ist, daß Cozymase ähnlich wie Adenosintriphosphat und Adenylsäure Phosphat von Phosphobrenztraubensäure auf Glucose zu übertragen vermag[1], so lag es nahe zu prüfen, ob nicht Cozymase die Funktion der Adenosintriphosphorsäure auch in der Koppelungsreaktion übernehmen und also als das gemeinsame Molekül wirken könnte.

In dieser zusammen mit Herrn Professor *Meyerhof* begonnenen Arbeit habe ich untersucht, wieweit Cozymase den Gesamtverlauf der Gärung und einzelne Teilreaktionen als einziges Co-Ferment zu katalysieren imstande ist, und wieweit die Rolle der Adenosintriphosphorsäure im Spiel der Koppelungsreaktion zu erkennen ist. Als Fermentpräparat dienten dabei Hefemacerationssaft und Muskelextrakt, beide ausdialysiert. Es ergab sich, daß bei Anpassung der anorganischen Ionen an physiologische Verhältnisse sämtliche untersuchten Reaktionen mit Cozymase allein verlaufen und daß in wenigen Fällen eine Beschleunigung der Reaktion durch Adenosintriphosphorsäure zu beobachten ist.

I. Cozymase als Co-Ferment im Gesamtverlauf der alkoholischen Gärung.

Bisher war nur ein System bekannt, in dem Cozymase als *einziges* Co-Ferment die Gärung katalysiert, nämlich ausgewaschene Trockenhefe nach *Myrbäck*. Wählt man als Fermentpräparat ausdialysierten, d. h. von den eigenen Co-Fermenten befreiten Hefemacerationssaft, so bleibt in Gegenwart von Cozymase und Na-K-Phosphatpuffer der Zucker unangegriffen. Der Grund dafür liegt in der Hemmung des Systems durch Natrium. Schon der Zusatz kleinerer Mengen Mangan, hebt hier, wie wir es früher in anderen Systemen fanden[1], diese Hemmung auf. Ersetzt man aber das Natrium in allen Zusätzen durch Ammonium, so setzt eine kräftige Gärung ein, die den eingesetzten Mengen Cozymase so gut proportional verläuft, daß die Methode zur quantitativen Be-

[1] *P. Ohlmeyer* u. *S. Ochoa*, diese Zeitschr. **293**, 338, 1937.

stimmung von Cozymase dienlich sein könnte. Zusatz von Adenosintriphosphorsäure beeinflußt die Geschwindigkeit fast nicht. Ein solcher Versuch ist in Tabelle I dargestellt. Die Mengen Adenosintriphosphat sind dort in γ Pyro-P_2O_5 angegeben, Cozymase, die Adenylsäure als Baustein enthält, der besseren Vergleichbarkeit wegen in γ Adenylsäure-P_2O_5.

Tabelle I. Gärung in dialysiertem Macerationssaft.

0,5 ccm Macerationssaft, 16 Stunden gegen Wasser dialysiert; 33 mg Glucose; 0,07 mol. Ammonphosphat vom p_H 6,4; 130 γ P_2O_5-Hexosediphosphat, 120 γ Acetaldehyd, 150 γ Mg, 15 γ Mn; Volumen: 1,0 ccm, $t = 28°$, im Gasraum N_2. Manometrische Messung. Zwei Versuche a und b.

Zeit	cmm CO_2						
	a				b		
Min.	0	0,5 γ Cz	1 γ Cz	2 γ Cz	0	4 γ Cz	4 γ Cz + 4 γ Adenosintriphosphat
60	18	59	71	132	15	333	290
70	26	75	99	189	16	600	560
80	37	93	133	261	18	870	835
90	46	114	172	351	20	1120	1090

II. Die Wirkung der Cozymase bei der Koppelungsreaktion der Gärung.

Will man die reine Koppelungsreaktion in dialysiertem Macerationssaft untersuchen, so ist Zusatz von Fluorid erforderlich, da sonst die durch Dehydrierung von Glycerinaldehydphosphorsäure entstandene Phosphoglycerinsäure in das Gleichgewicht mit Phosphobrenztraubensäure tritt, und diese durch Umesterung des Phosphats auf Hexosemonophosphat eine vollständige Gärung in Gang setzt. Andererseits war es aus später zu besprechenden Gründen erwünscht, nach Ablauf der Koppelungsreaktion zu prüfen, wieweit die eingesetzte Cozymase gärungsaktiv erhalten geblieben war, und für diesen Zweck darf Fluorid als Inhibitor nicht anwesend sein. Deshalb wurde diese Reaktion ohne und mit Fluorid untersucht. Der im ersten Versuch (Tabelle II) auftretende Kohlensäuredruck stammt aus dem carboxylatischen Zerfall von Brenztraubensäure, die auf dem beschriebenen Wege aus Phosphoglycerinsäure entstanden ist, und läßt daher die Menge der letzteren errechnen (1 Mol CO_2 = 1 Mol Phosphoglycerinsäure). Nach der Gleichung der Koppelungsreaktion (6) wird dabei 1 Mol anorganisches Phosphat mit Zucker verestert. So ist es in Tabelle II der Fall. Die der Dehydrierung unterliegende Glycerinaldehydphosphorsäure entsteht hier im Gleichgewicht aus Hexosediphosphat[1], der nach der Glei-

[1] Vgl. *O. Meyerhof*, Bull. Soc. Chim. Biol. **20**, Nr. 9 bis 10, 1938.

Tabelle II. Koppelungsreaktion in Macerationssaft ohne Fluorid. 1,0 ccm Macerationssaft, 22 Stunden dialysiert, 2,8 mg P_2O_5 Hexosediphosphat, 0,4 mg Acetaldehyd, 9 mg Glucose, 2,8 mg P_2O_5 Ammoniumphosphat vom p_H 6,7, 50 γ Mg, 15 γ Mn. Volumen: 2,15 ccm, $t = 28°$, im Gasraum N_2. Angaben der Co-Fermente: Cz in γ Adenylsäure-P_2O_5, Adenosintriphosphat in γ Pyro-P_2O_5.

Versuch Nr.		1	2	3	4	5	6	7
	Zeit Min.	0	1 γ Cz	5 γ Cz	10 γ Cz	10 γ Cz +20 γ Adenosintriphosphat	10 γ Cz	10 γ Cz
cmm CO_2 gebildet	15	7	23	50	71	80	82	89
	20	10	34	70	101	112	125	120
	40	20	67	160	261	245	—	—
	70	30	102	270	495	493	—	—
Aus CO_2 für 70 bzw. 20 Min. berechnete Phosphoglycerinsäure in mg P_2O_5		—	—	0,86	1,58	1,56	0,40	—
mg P_2O_5 verestert		—	—	0,87	1,34	1,41	0,54	—

chung (2a) der Hydrierung unterliegende Acetaldehyd, über die kleine vorgelegte Menge hinaus, aus der Spaltung der Brenztraubensäure.

Die Versuche 1 bis 4 zeigen die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Cozymasemenge, aus Versuch 5 ergibt sich ihre Unabhängigkeit von Adenosintriphosphorsäure. Der Versuchsansatz 7 wurde zum Zwecke der quantitativen Cozymasebestimmung aufgearbeitet: Nach 20 Minuten Reaktion im Koppelungsansatz waren 12% der eingesetzten Cozymase irreversibel zerfallen. Die in dieser Anordnung unumgänglichen Mängel sind im nächsten Versuch durch Zusatz von Fluorid beseitigt. Dort bleibt die gebildete Phosphoglycerinsäure liegen, sie läßt sich polarimetrisch[1] bestimmen, im manometrischen Versuch wird sie aus der Austreibung von 1 Mol Kohlensäure aus Bicarbonat errechnet. Auch dieser Vorgang (Tabelle III) läuft bei Zusatz reiner Cozymase ab; indessen erteilt Adenosintriphosphorsäure der Reaktion eine merkliche Beschleunigung.

Die Koppelung zwischen Oxydoreduktion und Phosphorylierung besagt, daß erstere in Abwesenheit eines Phosphatakzeptors nicht oder nur mit der Geschwindigkeit verlaufen kann, die durch die Geschwindigkeit der Wiederaufspaltung eines intermediär phosphorylierten Co-Ferments gegeben ist. Nimmt man nun an, daß die Adenosinphosphorsäuren auch hier die Rolle eines Phosphatüberträgers spielen, so sollte man erwarten, daß die an sich kleine Geschwindigkeit der Oxydoreduktion mit Vergrößerung der Menge Adenosintriphosphorsäure stiege. Denn durch phosphatatischen Zerfall stände Adenosindi-

[1] *O. Meyerhof* u. *W. Schulz*, diese Zeitschr. **297**, 60, 1938.

Tabelle III. Koppelungsreaktion in Macerationssaft mit Fluorid.

0,3 ccm Macerationssaft, 16 Stunden dialysiert, 2,0 mg P_2O_5 Hexosediphosphat, 2,7 mg Acetaldehyd, 2,0 mg P_2O_5 Ammoniumphosphat, 6 mg Glucose, 50 γ Mg, 15 γ Mn, 0,04 mol. Ammoniumfluorid, $2 \cdot 10^{-2}$ mol. Ammoniumbicarbonat, p_H 7,4, Volumen: 1,18 ccm; $t = 28°$; im Gasraum 5% CO_2 in N_2. Angaben der Co-Fermente: Cz in γ Adenylsäure-P_2O_5, Adenosintriphosphorsäure in γ Pyro-P_2O_5.

	Zeit Min.	Co-Fermentzusätze			
		0	5 γ Cz	5 γ Cz + 20 γ Adenosintriphosphorsäure	60 γ Cz
cmm CO_2 ausgetrieben	3	1	22	55	50
	6	2	69	165	156
	9	3	118	228	256
	15	5	214	335	335
	30	16	370	351	375
Aus CO_2 für 30 Min. berechnet. Phosphoglycerinsäure in mg P_2O_5	—	0,05	1,18	1,10	1,2
mg P_2O_5 Phosphoglycerinsäure (polarimetrisch)	—	0,04	1,40	1,38	1,46
Änderung des anorganischen P_2O_5	—	+ 0,15	− 1,22	− 1,22	− 1,25

Tabelle IV. Oxydoreduktion in Macerationssaft ohne Phosphatakzeptor.

0,35 ccm Macerationssaft, 16 Stunden dialysiert, 2,5 mg P_2O_5 Hexosediphosphat, 2 mg Acetaldehyd, 50 γ Mg, 15 γ Mn, 0,5 mg P_2O_5 Ammoniumphosphat, 0,05 mol. Ammoniumfluorid, $2 \cdot 10^{-2}$ mol. Ammoniumbicarbonat; $p_H = 7{,}4$; Volumen: 1,0 ccm; $t = 28°$; im Gasraum 16% CO_2 in N_2. Angaben der Co-Fermente: Cz in γ Adenylsäure-P_2O_5, Adenosintriphosphorsäure in γ Pyro-P_2O_5.

	Zeit Min.	Co-Fermentzusätze					
		0	9 γ Cz	9 γ Cz + 300 γ Adenosintriphosphorsäure	70 γ Cz	$0{,}6 \cdot 10^{-3}$ mol. Arseniat	
						5 γ Cz	5 γ Cz + 400 γ Adenosintriphosphorsäure
cmm CO_2 ausgetrieben	5	3	18	10	20	130	145
	10	20	45	28	50	267	324
	15	36	65	43	73	350	425
	20	44	74	53	87	400	465
Aus CO_2 für 20 Min. berechnete Phosphoglycerinsäure in mg P_2O_5		0,14	0,23	0,17	0,28	—	—
mg P_2O_5 Phosphoglycerinsäure (polarimetrisch)		0,10	0,21	0,18	0,34	—	—

phosphorsäure immer erneut als „intermediärer Energie- und Phosphatakzeptor" zur Verfügung. Der Versuch Tabelle IV zeigt, daß große Mengen Adenosintriphosphorsäure im System ohne Phosphatakzeptor

keine Beschleunigung bewirken. Erst wenn Arseniat zugegen ist, das die Koppelung zwischen Oxydoreduktion und Phosphorylierung löst[1], steigt die Geschwindigkeit erheblich an. Dieses Ergebnis kann wohl nur so erklärt werden, daß ein anderes Phosphorylierungsprodukt (etwa das der Cozymase) so rasch wieder zerfällt, daß die Aufspaltungsgeschwindigkeit der Adenosintriphosphorsäure immer noch niedriger liegt. Sichere Schlüsse auf das Verhalten der Cozymase in Gegenwart eines Phosphatakzeptors läßt dieser Versuch jedoch nicht zu.

Die bisher angeführten Ergebnisse wurden mit ausdialysiertem Macerationssaft gewonnen. Wendet man statt dessen das Gärtestprotein B nach *Warburg* und *Christian* für die Koppelungsreaktion an, so tritt, wie diese Autoren und auch *Meyerhof* und Mitarbeiter in zahlreichen Versuchen fanden, mit Cozymase allein keine Reaktion ein. Wir haben festgestellt, daß hier das Adenylsäuresystem auch in Abwesenheit von Natrium erforderlich ist. Diese Tatsache dürfte damit zusammenhängen, daß Protein B nur einen Teil der Fermentproteine der Hefe enthält.

III. Die Co-Fermentwirkung von Cozymase bei der Milchsäurebildung.

Da man in ausdialysiertem Muskelextrakt keine Milchsäurebildung aus Glykogen erhalten kann[2], so bleibt zur Untersuchung der Cozymasewirkung bei der Glykolyse nur ein Studium der Zwischenreaktionen übrig. Hier spielt sich die Oxydoreduktion nach den Gleichungen (1) und (2b) ab; als Wasserstoffüberträger dient, wie in der Hefe, Cozymase; mit ihrer Hydrierung ist die Aufnahme von Phosphat verknüpft. Als Phosphatakzeptor wurde in dem Versuch der Tabelle V Kreatin verwandt. Dieser Versuch — wie der analoge Versuch der Tabelle III — zeigt einerseits eine beträchtliche Aktivität reiner Cozymase, andererseits eine unverkennbare Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Adenosintriphosphat. Anders liegen die Verhältnisse bei einer Anordnung, die den „Rückweg" der Koppelung zu untersuchen gestattet. Bei diesem Vorgang läuft die Oxydoreduktion folgendermaßen ab

$$\text{Phosphoglycerinsäure} + \text{Milchsäure} \rightarrow \text{Glycerinaldehydphosphorsäure} + \text{Brenztraubensäure}. \quad (7)$$

Die mit ihm gekoppelte Reaktion ist in dieser Richtung eine Freisetzung von gebundenem Phosphat, etwa aus Kreatinphosphorsäure oder Phosphobrenztraubensäure. Der Vorgang läuft aber freiwillig nur bis zur Erreichung der Gleichgewichtslage ab, die hier nur wenig von der

[1] *O. Meyerhof, W. Kiessling* u. *W. Schulz*, diese Zeitschr. **292**, 54, 1937. — [2] *O. Meyerhof* u. *P. Ohlmeyer*, ebenda **290**, 342, 1937.

Tabelle V. Koppelungsreaktion in Muskelextrakt.

0,35 ccm Kaninchen-Muskelextrakt, 36 Stunden gegen Wasser dialysiert, 2,5 mg P_2O_5 Hexosediphosphat, 2,7 mg Brenztraubensäure, 6 mg Kreatin, 2,5 mg P_2O_5 Ammoniumphosphat, 0,05 mol. Ammoniumfluorid, 50 γ Mg, 15 γ Mn, 2 . 10^{-2} mol. Ammoniumbicarbonat; p_H 7,4; Volumen: 1,45 ccm; $t = 28°$; im Gasraum 16 % CO_2 in N_2. Angaben der Co-Fermente: Cz in γ Adenylsäure-P_2O_5, Adenosintriphosphorsäure in γ Pyro-P_2O_5.

	Zeit Min.	Zusätze			
		0	9 γ Cz	9 γ Cz + 20 γ Adenosintriphosphorsäure	70 γ Cz
cmm CO_2 ausgetrieben	5	1	40	150	52
	10	4	94	250	126
	15	8	140	310	186
Aus CO_2-Druck für 15 Min. berechnete Phosphoglycerinsäure in mg P_2O_5		0,02	0,45	0,98	0,59
mg P_2O_5 Phosphoglycerinsäure (polarimetrisch)		0,04	0,56	0,95	0,70
mg P_2O_5 anorganisches Phosphat verestert		0,22	0,59	0,92	0,74

Ausgangslage entfernt ist; um ihn zum Zwecke besserer Untersuchung weiterzutreiben, muß man das Gleichgewicht durch Fortschaffen eines Endproduktes verschieben. Dies wird durch Zugabe von Cyanid erreicht[1], das die gebildete Glycerinaldehydphosphorsäure laufend abfängt. In dem folgenden Versuch ist Phosphoglycerinsäure einerseits das Substrat der Hydrierung, andererseits fungiert sie im Gleichgewicht mit Phosphobrenztraubensäure als Substrat der Dephosphorylierung (Tabelle VI).

Tabelle VI. „Rückreaktion" in Muskelextrakt.

1,2 ccm Muskelextrakt, 36 Stunden gegen Wasser dialysiert, 2,7 mg P_2O_5 Phosphoglycerinsäure; 0,05 mol. Lactat, 1 mg P_2O_5 Ammoniumphosphat, 0,13 mol. KCN, 100 γ Mg, 30 γ Mn, 2 . 10^{-2} mol. Ammoniumbicarbonat; $p_H = 7{,}4$; Volumen: 3,5 ccm; $t = 28°$; im Gasraum: 5 % CO_2 in N_2. Reaktionszeit 30 Minuten. Angaben der Co-Fermente: Cz in γ Adenylsäure-P_2O_5, Adenosintriphosphat in γ Pyro-P_2O_5.

	Zusätze			
	0	30 γ Cz	30 γ Cz + 60 γ Adenosintriphosphorsäure	60 γ Adenosintriphosphorsäure
mg P_2O_5 Glycerinaldehydphosphorsäure gebildet	0,30	1,16	1,28	0,14
mg P_2O_5 Phosphat abgespalten ..	0,24	1,37	1,32	0,23

[1] *O. Meyerhof, P. Ohlmeyer* u. *W. Möhle*, diese Zeitschr. **297**, 118, 1938.

Die Geschwindigkeit der Reaktion läßt sich an dem negativen Kohlensäuredruck verfolgen, der sich aus dem Verschwinden der Säurevalenz der Phosphoglycerinsäure ergibt. Die besonderen Verhältnisse dieses Ansatzes (KCN) verhinderten eine Übereinstimmung zwischen manometrischer und chemischer Messung; der Druckverlauf ließ indessen klar erkennen, daß der nach 30 Minuten erreichte Endpunkt der Reaktion mit einer von Adenosintriphosphat unabhängigen Geschwindigkeit erzielt wurde.

Auch die Oxydoreduktion ohne Phosphatakzeptor wurde in Muskelextrakt untersucht. Wie in Macerationssaft, so haben auch hier große Mengen Adenosintriphosphat nicht die Wirkung eines „intermediären Phosphatakzeptors". (Vgl. das zu Tabelle IV Gesagte.)

Tabelle VII. Oxydoreduktion in Muskelextrakt ohne Phosphatakzeptor.

0,35 ccm Muskelextrakt, 36 Stunden dialysiert, 2,5 mg P_2O_5 Hexosediphosphat, 2,7 mg Brenztraubensäure, 0,5 mg P_2O_5 Ammoniumphosphat, 50 γ Mg, 15 γ Mn, 0,05 mol. Ammoniumfluorid, $2 \cdot 10^{-2}$ mol. Ammoniumbicarbonat; p_H 7,4; Volumen: 1,0 ccm; $t = 28°$; im Gasraum 10% CO_2 in N_2. Angaben der Co-Fermente: Cz in γ Adenylsäure-P_2O_5; Adenosintriphosphorsäure in γ Pyro-P_2O_5.

	Zeit Min.	Zusätze		
		0	9 γ Cz	9 γ Cz + 300 γ Adenosintriphosphorsäure
cmm CO_2 ausgetrieben	20	42	63	75
	40	64	114	111
	60	78	160	140
Aus CO_2 für 60 Min. berechnet. Phosphoglycerinsäure in mg P_2O_5		0,24	0,51	0,45
mg P_2O_5 Phosphoglycerinsäure (polarimetrisch)		0,23	0,54	0,53

IV. Zur umphosphorylierenden Wirkung von Cozymase und Dihydrocozymase.

In einer früheren Arbeit haben wir gezeigt[1], daß die Umesterung des Phosphats von Phosphobrenztraubensäure auf Glucose neben den Adenosinphosphorsäuren auch von Cozymase katalysiert werden kann. Dort war auch die „Cophosphorylasewirkung" von erschöpfend hydrierter Cozymase (Hexahydrocozymase) behandelt worden. In neueren Versuchen haben wir die Wirkung von Cozymase und von Dihydrocozymase in diesem System miteinander verglichen. Die Dihydrocozymase war ein Präparat von höchster Reinheit, wie es an anderer Stelle beschrieben

[1] *P. Ohlmeyer* u. *S. Ochoa*, diese Zeitschr. **293**, 346, 1937.

ist[1]. Zwecks Verhinderung eines Überganges von Dihydrocozymase in Cozymase, der in Gegenwart von Phosphobrenztraubensäure ($\rightleftarrows$ Phosphoglycerinsäure) nach Gleichung (5) möglich wäre, wurde ein besonderer Versuchsansatz mit Jodessigsäure versetzt, da diese jenen Übergang hemmt[2].

Tabelle VIII. Umphosphorylierung von Phosphobrenztraubensäure auf Glucose.

Ansatz a): 0,4 ccm Macerationssaft, 15 Stunden gegen Wasser dialysiert, mit 0,1%iger Jodessigsäure vergiftet, 2,5 mg P_2O_5 Ammoniumphosphat, 50 γ Mg, 1 mg P_2O_5 Phosphobrenztraubensäure, 3 mg Glucose, 65 γ P_2O_5 Hexosediphosphat; $p_H = 6{,}4$; Volumen: 1,0 ccm; $t = 28^0$; im Gasraum N_2. Ansatz b): wie a), aber unvergifteter Macerationssaft. Manometrische Messung. Angaben der Co-Fermente: Adenylsäure in γ P_2O_5 Cozymase in γ Adenylsäure-P_2O_5. Der Druck stammt aus der carboxylatischen Spaltung dephosphorylierter Brenztraubensäure.

Zeit	cmm CO_2						
	a) mit Jodessigsäure				b) ohne Jodessigsäure		
Min.	0	6 γ Adenylsäure	12 γ Cz	12 γ CzH_2	6 γ Adenylsäure	12 γ Cz	12 γ CzH_2
5	8	3	1	5	120	77	94
10	13	28	2	29	246	242	288
20	16	176	110	83	—	—	—
30	19	216	197	185	—	—	—

Die Tabelle zeigt, daß der Anlauf der Umesterung mit Cozymase und Dihydrocozymase in beiden Versuchsgruppen fast so schnell vor sich geht wie mit der Menge Adenylsäure, die chemisch der Hälfte äquivalent ist. Das bedeutet, daß Cozymase und Dihydrocozymase in diesem System einander gleichwertig und beide etwa halb so aktiv wie Adenylsäure sind.

V. Wirkt Cozymase vermöge eines Begleitstoffes oder infolge irreversiblen Zerfalls?

Alle hier untersuchten Reaktionen laufen schon bei Zugabe von Cozymase ab; durch das Adenylsäuresystem werden nur einige beschleunigt. Wollte man diesen Befund als Argument für die Entbehrlichkeit des Adenylsäuresystems heranziehen, so müßte zunächst ausgeschlossen sein, daß dieses als Verunreinigung der Cozymase ungewollt immer zugegen war. Nun gehört das verwandte Cozymasepräparat zu den reinsten, die wir besitzen; Fremdstoffe in Spuren (darunter Adenosintriphosphorsäure) können niemals ausgeschlossen werden, jedoch

[1] *P. Ohlmeyer*, diese Zeitschr. **297**, 66, 1938. — [2] *O. Meyerhof, P. Ohlmeyer* u. *W. Möhle*, ebenda **297**, 102, 1938.

wenige Prozent übersteigen sie ganz sicher nicht. Wenn man sie aber für das Zustandekommen der Reaktionen verantwortlich machen wollte, so würde folgendes gelten: Nach der Koppelungsgleichung müßten die zwei Co-Fermente in äquimolaren Mengen synchron reagieren (weil z. B. bei der Hydrierung von 1 Molekül Cozymase 1 Molekül Phosphat mit 1 Molekül Adenosindiphosphat verestert wird). Bei ungleichen Mengen der beiden Co-Fermente könnte nicht etwa durch umgekehrt proportionale Geschwindigkeitskonstanten beiderseits volle Ausnutzung zustandekommen. Es wäre also die Proteinverbindung der in Spuren vorhandenen Adenosinphosphorsäure der geschwindigkeitsbestimmende Faktor, fast die gesamte Cozymase wäre unbeteiligt und brächte die Reaktion bei einem Überschuß an Protein erst dann auf die maximale Geschwindigkeit, wenn ihr eine äquimolare Menge Adenosinphosphorsäure zur Verfügung stände. Tabelle IX zeigt aber, daß Adenosintriphosphat eine solche Komplettierung des Systems nicht herbeiführt.

Tabelle IX. Koppelungsreaktion in Macerationssaft, Überschuß an Protein.

1,0 ccm Macerationssaft, 16 Stunden gegen Wasser dialysiert, 3 mg P_2O_5 Hexosediphosphat, 3 mg P_2O_5 Ammoniumphosphat, 0,4 mg Acetaldehyd, 9 mg Glucose, 50 γ Mg, 15 γ Mn; p_H 7,0; Volumen: 2,15 ccm; im Gasraum N_2. Manometrische Messung. Angaben der Co-Fermente: Cz in γ Adenylsäure-P_2O_5, Adenosintriphosphorsäure in γ Pyro-P_2O_5.

Zeit Min.	cmm CO_2					
	0	0,5 γ Cz	0,5 γ Cz + 1 γ Adenosintriphosphorsäure	1 γ Cz	1 γ Cz + 2 γ Adenosintriphosphorsäure	4 γ Cz
3	16	18	18	19	17	26
6	33	50	55	62	58	145
9	57	98	110	131	131	335
12	84	161	178	227	224	480
15	114	233	257	337	337	622
18	148	312	348	447	454	725
21	180	400	432	552	551	790

In diesem Versuch wird die mit den kleinen Cozymasemengen erreichte Reaktionsgeschwindigkeit nicht durch Adenosintriphosphat beschleunigt. Das Protein ist aber im Überschuß, denn mit den größeren Cozymasezusätzen tritt eine Steigerung ein. Hieraus ist nach dem Gesagten zu folgern, daß Cozymase und Adenosintriphosphat nicht im stöchiometrischen Verhältnis an der Reaktion beteiligt sind, und mithin deren Zustandekommen nicht an das Vorhandensein der letzteren als Begleitstoff in der Cozymase geknüpft ist.

Die gleichen Überlegungen gelten für die Fälle, in denen ein kleiner Bruchteil der Cozymase durch das Ferment irreversibel zerstört wird.

Ein Beispiel dafür ist im Anschluß an Tabelle II mitgeteilt worden. Da nach den Feststellungen *v. Eulers* die Cozymase Adenylsäure als Baustein enthält, muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß letztere enzymatisch herausgespalten wird und zusammen mit intakter Cozymase die Koppelungsreaktion katalysiert. Der irreversible Zerfall beträgt nach zahlreichen Versuchen jedoch im Mittel nur 10%; die unbeteiligten 90% müßten, mit mindestens der stöchiometrischen Menge Adenosintriphosphat ergänzt, eine höhere Geschwindigkeit ergeben; und das tun sie nicht.

Diskussion.

Den früher[1] mitgeteilten Überlegungen über den Mechanismus der Koppelung lassen sich nunmehr die folgenden anschließen. Sie beziehen sich auf die mit dem vollständigen Proteinsystem erhobenen Befunde. Es gibt zwei Möglichkeiten: Entweder wird die Koppelungsreaktion durch stöchiometrische Mengen beider Co-Fermente herbeigeführt; dann sind die vorstehenden Ergebnisse schwerlich zu erklären. Oder das Adenylsäuresystem ist bei der eigentlichen Koppelungsreaktion überhaupt nicht beteiligt; dann muß der Cozymase (vielleicht in einem besonderen Zustand) auch die Fähigkeit zur Katalyse einer Phosphatveresterung zugeschrieben werden. Sie bildete dann das gesuchte Molekül, das der Oxydoreduktion und der Phosphorylierung gemeinsam ist. Es hieße nicht, daß das Adenylsäuresystem mit der Koppelung nicht verknüpft sein könnte. Viele der früheren Versuche sind ja mit Adenosindiphosphat als Phosphatakzeptor angestellt worden, und es wäre denkbar, daß das in der Elementarreaktion von Cozymase aufgenommene Phosphat über Adenylsäure von anderen Akzeptoren übernommen würde. Ja, es ergäben sich keine Widersprüche, wenn man annähme, daß die Umphosphorylierung von Cozymase auf Glucose oder Kreatin bei Zwischenschaltung des Adenylsäuresystems rascher verliefe. So wäre denn die in einigen Systemen gefundene Beschleunigung zu erklären, und so etwas wäre besonders bei den von *Parnas* und von *Lohmann* untersuchten Reaktionen zwischen Adenosintriphosphorsäure und Kreatin geradezu zu erwarten. Der Inhalt der zweiten Vorstellung wäre bloß das eine, daß Cozymase als wasserstoffübertragendes und zugleich phosphorylierendes Co-Ferment die Koppelungsreaktion katalysieren kann.

Eine Phosphatverbindung von Cozymase ist bisher unbekannt. Daß sie sehr labil sein müßte, geht aus unseren Versuchen ohne Phosphatakzeptor hervor. Mit Phosphobrenztraubensäure läßt Cozymase sich

[1] Diese Zeitschr **297**, 132, 1938.

enzymatisch nur zu 10 bis 15% phosphorylieren. Wir haben auch versucht, wieweit sich die Reaktion

Glycerinaldehydphosphorsäure + Cozymase + Phosphorsäure
→ Phosphoglycerinsäure + Dihydrocozymasephosphat

verwirklichen läßt. Es wurden 60% der stöchiometrisch möglichen Menge Phosphoglycerinsäure gebildet, das reinste Präparat von Cozymase nahm zu etwa 10% Phosphat auf. Nach der Gleichung müßte 1 Molekül Cozymase 1 Molekül Phosphat wenigstens intermediär anlagern, damit 1 Molekül Phosphoglycerinsäure entstehen kann.

Die Bildung einer Adenosinphosphorsäure durch reversiblen Zerfall der Cozymase bei der Hydrierung ist nach der Isolierung reiner hydrierter Cozymase[1] und nach unseren Versuchen mit radioaktivem Phosphor[2] nicht anzunehmen.

Wenn Cozymase im vollständigen Proteinsystem auch als Co-Ferment der Phosphatveresterung zu fungieren vermag, so bedarf es noch der Erklärung dafür, warum in Protein B das Adenylsäuresystem unentbehrlich ist. Die weitere Untersuchung muß zeigen, ob hier etwa ein Protein fehlt, das die Cozymase zur Phosphatübertragung in der Koppelungsreaktion befähigt.

Herrn *K. Wacker* danke ich für seine Mitarbeit bei den Versuchen.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß Cozymase in ausdialysiertem Hefemacerationssaft die *Meyerhof*sche Koppelungsreaktion in der alkoholischen Gärung und deren Gesamtverlauf katalysieren kann und daß das Adenylsäuresystem dabei entbehrlich ist. An dieser Wirkung ist ein irreversibler Zerfall von Cozymase nicht beteiligt.

Versuche über die Milchsäurebildung im Verlauf der Koppelungsreaktion in Muskelextrakt ergeben ein analoges Resultat.

Die Umphosphorylierung von Phosphobrenztraubensäure auf Glucose verläuft in Macerationssaft mit Dihydrocozymase als Co-Ferment ebenso wie mit Cozymase.

---

[1] *P. Ohlmeyer*, diese Zeitschr. **297**, 67, 1938. — [2] *O. Meyerhof, P. Ohlmeyer, W. Gentner* u. *H. Maier-Leibnitz*, ebenda **298**, 406, 1938.

Über die chemische Konstitution des Cytochroms c.

IV. Mitteilung:

Darstellung von Porphyrin-Cystein-Addukten.

Von

Hugo Theorell.

(Aus der biochemischen Abteilung des Medizinischen Nobelinstituts, Stockholm.)

(Eingegangen am 13. April 1939.)

In den vorhergehenden Mitteilungen (1) (2) (3) wurde gezeigt, daß man bei der salzsauren Hydrolyse des „Porphyrin c" schwefelhaltige Porphyrine erhält. Lang andauernde Hydrolyse (72 Stunden, 20%ige Salzsäure, 100° im Vakuum) ergab Produkte, die pro Mol 2 Atome Schwefel enthielten. Die beiden S-Atome sind darin mit den zwei- bzw. vierständigen Seitenketten des Porphyrins durch Thioätherbindungen verknüpft. Spaltung der entsprechenden Eisenkomplexe mit HBr-Eisessig ergab als Hauptprodukte Hämatoporphyrin und l-Cystein (3).

Da nun kürzere Hydrolyse schwefelärmere Produkte ergeben hatte (1), war es von Interesse, die Hydrolysebedingungen noch näher zu studieren. Es ließ sich nämlich entgegen früheren Annahmen denken, daß ein oder beide S-Atome *während der Hydrolyse* mit dem Porphyrin verknüpft würden. Es wurden zu diesem Zwecke einerseits Porphyrin c aus Cytochrom unter verschiedenen Bedingungen hydrolysiert, andererseits unter ähnlichen Verhältnissen Protoporphyrin IX, Hämatoporphyrin IX und Mesoporphyrin IX mit l-Cystein und Salzsäure in evakuierten, zugeschmolzenen Kolben erwärmt.

Das Protoporphyrin wurde nach *Fischer* und *Pützer* (4) aus Protohämin dargestellt und als Hydrochlorid kristallisiert. Käufliches Hämatoporphyrin wurde durch Fraktionieren mit Äther-Salzsäure und Kristallisieren als Hydrochlorid gereinigt. Mesoporphyrin wurde aus Protohämin nach *Fischer* und *Pützer* (5) mit Ameisensäure und kolloidalem Palladium dargestellt und nach Methylieren als Dimethylester rein kristallisiert.

In den Syntheseversuchen wurden pro 1 Mol Porphyrin 6 Mol l-Cystein zugegeben, weil Cytochrom c 6 Atome Schwefel enthält (6). In einigen Versuchen mit Proto-, Hämato- und Mesoporphyrin wurde eine dem Porphyrin äquivalente Menge Ferrosulfat zugegeben, weil eine katalytische Wirkung des Eisens möglich erschien. Bei der Hydrolyse von Porphyrin c aus Cytochrom c war ja die entsprechende Eisenmenge von vornherein vorhanden. Indessen zeigten Kontrollversuche, daß das

Tabelle I.

Nr.	Ausgangsmaterial	Behandlung (Molarität der Lösungen in bezug auf Porphyrin = $0{,}4 \cdot 10^{-3}$)	Löslichkeit in Äther am isoelektrischen Punkt	Spektrum in n HCl (Gitterspektroskop)	% S	% Amino-N (v. *Slyke*)	Atome Amino-N: Atome S	% Gesamt-N
1	Cytochrom c, mit HCl enteisent = „Porphyrin c“	5 Std. 100° C, 25 % HCl; Vakuum	Unlöslich	—	3,08	3,06	2,27	10,56
2	Dasselbe	25 „ 100° C, 25 % „ „	„	—	4,57	3,27	1,64	—
3a	„	72 „ 100° C, 20 % „ „	„	—	7,27	3,15	0,99	9,67
3b	„	72 „ 100° C, 20 % „ „	„	—	7,05	2,50	0,81	9,78
4	„	6 „ in mit HCl gesättigter Lösung unter Rückflußkühlung gekocht	„	551,0, (575), 595,8	8,38	2,41	0,66	9,34
5	Protoporphyrin + Cystein	Wie 3	„	551,3, (575), 595,8	7,25	2,42	0,76	10,0
6	„ + „	„ 4	„	—	9,34	2,12	0,52	—
7	Hämatoporphyrin + „	„ 3	„	550,8, (575), 595,9	6,11	2,35	0,88	9,61
8	„ + „	„ 4	„	551,1, (575), 595,8	7,67	2,46	0,73	10,5
9	Mesoporphyrin + „	„ 3	Löslich	= Mesoporphyrin	—	—	—	—
		Porphyrindicystein-Addukt	$C_{40}H_{48}N_6O_8S_2$	berechnet	7,97	3,48	—	10,44

Eisen keine wahrnehmbare Wirkung ausübte. Es zeigte sich nun, daß Proto- bzw. Hämatoporphyrin beim Erwärmen mit Cystein in salzsaurer Lösung Produkte ergaben, die in jeder Hinsicht den durch die gleiche Behandlung des natürlichen „Porphyrin c“ gewonnenen Porphyrinen entsprachen. Die synthetischen Porphyrine wurden nach der Salzsäurebehandlung in der gleichen Weise gereinigt, wie dies früher für das natürliche Porphyrin c beschrieben wurde (2): isoelektrische Fällung und Fraktionieren des Pikrats in Aceton mit Benzol. Besonders wichtig war das Ergebnis, daß *Meso*porphyrin in keiner Weise mit Cystein in warmer Salzsäure reagiert.

Die Resultate sind in der Tabelle I zusammengefaßt.

Zur Tabelle I ist folgendes zu bemerken. Die Versuche 3a und 3b wurden von vielen gleichen deswegen angeführt, weil 3a den höchsten, 3b den niedrigsten Wert für Amino-N gaben.

Aus den synthetischen Versuchen 5 bis 9 ist ersichtlich, daß Schwefel und Aminostickstoff ins Proto- bzw. Hämatoporphyrinmolekül getreten sind, während Mesoporphyrin unter den gegebenen Umständen mit Cystein nicht reagiert. Schon dieser Befund läßt es als äußerst wahrscheinlich erscheinen, daß die Verknüpfung des Cysteins an den Vinylgruppen des Protoporphyrins bzw. den Oxyäthylgruppen des Hämatoporphyrins stattfindet, während die Äthylgruppen des Mesoporphyrins zur Anlagerung von Cystein unfähig sind. Des weiteren wurden nun die synthetischen Proto- bzw. Hämatoporphyrin-Cysteinverbindungen in die entsprechenden Eisenkomplexverbindungen übergeführt. Das Verhalten derselben gegenüber H Br-Eisessig wurde mit demjenigen der aus Cytochrom erhaltenen c-Hämine verglichen. Es war kein Unterschied zu finden. In allen Fällen trat Hämatoporphyrin auf, aber immer in Ausbeuten, die nur 30 bis 50% der theoretischen erreichten. Außer Hämatoporphyrin wurden teils kleine Mengen von ätherlöslichen Porphyrinen mit höherer Salzsäurezahl, teils in Äther unlösliche Porphyrine gebildet.

Die Spaltung von *Cytochrom c* mit H Br-Eisessig gibt eine viel höhere Ausbeute an Hämatoporphyrin. *Zeile* und *Reuter* (7) erhielten zwar bei der Spaltung von unreinem Cytochrom c nur 35% des theoretischen Wertes als Hämatoporphyrin. Unsere Spaltungsversuche ergaben aber, daß Cytochrom c bei dieser Spaltung fast restlos Hämatoporphyrin gibt. Daneben tritt eine kleine Menge von Porphyrin mit höherer Salzsäurezahl auf.

Der Reaktionsmechanismus in den synthetischen Versuchen scheint aus Analogiegründen folgender zu sein. *B. Holmberg* hat gezeigt (8), daß α-Phenäthylalkohol mit Thioglykolsäure bei Erwärmen mit Salzsäure α-Phenäthylthioglykolsäure gibt:

$$C_6H_5-CHOH-CH_3 + HS-CH_2-COOH = \begin{matrix} C_6H_5 \cdot CH \cdot CH_3 \\ | \\ S \cdot CH_2 \cdot COOH \end{matrix} + H_2O \qquad (I)$$

während Styrol mit Thioglykolsäure schon bei gewöhnlicher Temperatur β-Phenäthylthioglykolsäure gibt (9):

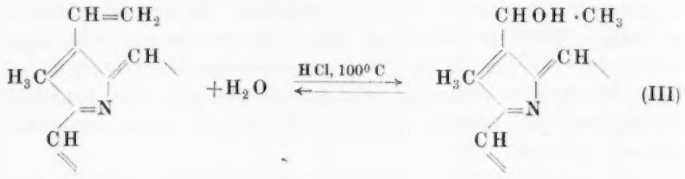
$$\begin{matrix} C_6H_5 - CH = CH_2 + HS - CH_2 - COOH \\ = C_6H_5 - CH_2 - CH_2 - S - CH_2 . COOH \end{matrix} \qquad (II)$$

Die Bindung des S-Atoms zum α-C-Atom ist verhältnismäßig labil. Sie läßt sich zwar nicht durch Kochen mit Mineralsäure auflösen, dagegen tritt bei Erhitzen mit Mercurisalzen oder mit Monohalogenessigsäuren Spaltung ein. Die Verknüpfung des S-Atoms mit dem β-Atom der Seitenkette ist dagegen sehr stabil.

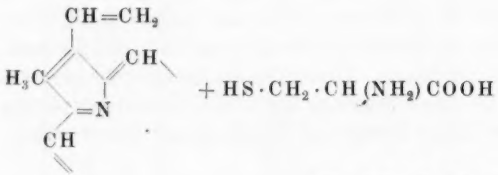
Es ist anzunehmen, daß die Reaktion zwischen Cystein und Proto- bzw. Hämatoporphyrin sowohl das α- als auch das β-ständige Addukt geben wird. Denn wie *Schumm* zuerst gefunden hat (10), stehen Hämato-

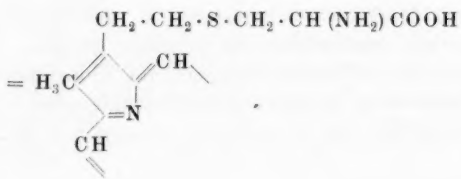
und Protoporphyrin in warmer Salzsäure miteinander in reversiblem Gleichgewicht. Wenn nun die Anlagerung des Cysteins viel langsamer als das Eintreten des Gleichgewichts verläuft, so muß es gleichgültig sein, ob man von Proto- oder Hämatoporphyrin ausgeht. Dies ist wahrscheinlich der Fall, weil HBr-Eisessig die Eisenkomplexe der aus Proto- bzw. Hämatoporphyrin + Cystein + HCl erhaltenen c-Porphyrine ungefähr in gleichem Ausmaße spaltete. Sie bestanden also wahrscheinlich aus einander ähnlichen Gemischen von α- bzw. β-substituierten Porphyrinen.

Die bisher angeführten Tatsachen lassen sich in den folgenden abgekürzten Formeln zusammenfassen.

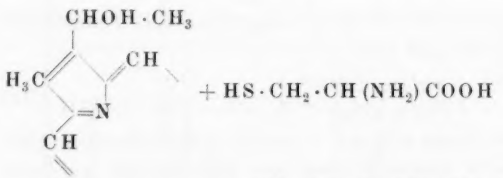


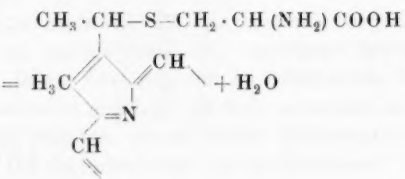
(III)





(IV)





(V)

Die entsprechenden Reaktionen müssen an den 4-ständigen Seitenketten stattfinden. Offenbar können dadurch vier verschiedene Isomere gebildet werden mit α, α-; α, β-; β, α-; und β, β-ständigen Cysteinresten.

Es werden indessen noch weitere Produkte gebildet, wie schon die Bestimmungen des Aminostickstoffs zeigen. Das atomare Verhältnis Amino-N : S sollte in den Additionsverbindungen offenbar = 1 bleiben, wenn keine weiteren Reaktionen stattfänden. Die Bestimmungen des Amino-N nach *v. Slyke* geben bekanntlich etwas zu hohe Werte für Cystein. Trotzdem wurde in den mit Salzsäure energisch behandelten Präparaten 3 bis 5, Tabelle I, zu wenig Amino-N gefunden. Dies beruht darauf, daß das Cystein in kochender Salzsäure langsam zerfällt. *Mörner* fand (11), daß salzsaures Cystein beim Erhitzen in wässeriger Lösung auf 145° zerfällt, wobei Ammoniak, Schwefelwasserstoff, d-Alanin und α-Thiomilchsäure gebildet wurden. Offenbar kann das Cystein auch unter den von mir eingehaltenen Hydrolysebedingungen teilweise gespalten werden. Es wurde auch früher beschrieben (2), daß bei der Einführung von Eisen ins Porphyrin C eine Spaltung eintreten kann, wenn man das Präparat länger als nötig in warmem Eisessig hält. Dabei wurde ein Präparat erhalten, „Monoamino-dithio-chlorhämin c", das auf zwei Atome S nur einen Amino-N und eine Carboxylgruppe enthielt. In späteren Versuchen konnten nach der HBr-Eisessigspaltung flüchtige Sulfhydrylverbindungen nachgewiesen werden. Nach Spaltung von verschiedenen c-Hämatinen mit HBr-Eisessig kam es nach der früher beschriebenen Weiterbehandlung (2) (3) oft vor, daß die „abgespaltene Seitenkette" einen widerlichen, an Thiomilchsäure erinnernden Geruch entwickelte. Eine solche Substanz wurde einer Vakuumdestillation bei 100° C Badtemperatur unterworfen. Das Destillat roch nach Mercaptan und gab eine schöne Nitroprussidreaktion. Das Destillat konnte wegen der geringen Menge nicht näher untersucht werden, auch war der Hauptzweck dieses Versuchs nur, flüchtige Sulfhydrylverbindungen nachzuweisen.

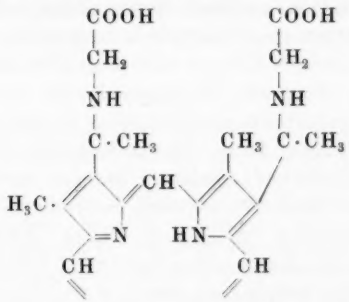
Angesichts der großen Kompliziertheit aller dieser Reaktionen, wobei immer in Hämato- und Protoporphyrin Cystein in verschiedene Stellungen eingeführt wird, und dabei gleichzeitig, früher oder später teilweise zerfällt, darf es kein Wunder nehmen, daß die erhaltenen Produkte nicht streng reproduzierbar sind, wie aus der Tabelle I hervorgeht. Auf Grund der weitgehenden Übereinstimmung zwischen den „natürlichen" c-Porphyrinen aus Cytochrom c und den synthetischen in bezug auf Elementaranalyse, Spektrum und Spaltbarkeit muß man annehmen, daß sie im wesentlichen gleichartig gebaut sind. Damit erhebt sich die Frage, inwieweit sie auch gleichartig entstehen.

Der Verfasser hat mehrere Beweise für die Auffassung vorgebracht, daß im Cytochrom c eine zweifache Art von Bindung zwischen Hämin

und Eiweißkomponente vorliegt, nämlich teils stabile Hauptvalenzbindungen zwischen der Eiweißkomponente und den zwei- bzw. vierständigen Seitenketten des Hämins (oder nur einer von diesen), teils eine koordinative Bindung zwischen irgendwelchen der Eiweißkomponente angehörigen Gruppen und dem Eisenatom. Diese Auffassung wird von den in dieser Arbeit angeführten Tatsachen nicht beeinflußt. Dagegen läßt sich die frühere Auffassung über die Bindung zwischen Eiweißkomponente und Hämin durch zwei Schwefelatome nicht aufrechterhalten. Die experimentellen Tatsachen schließen es allerdings nicht aus, daß ein Atom S in der fraglichen Thioätherstellung *präformiert* vorhanden sein könnte, denn in keinem Porphyrin C-Präparat wurde mit Sicherheit *weniger* als ein Atom S gefunden. Andererseits reichen die 3,08% S im Präparat 1 knapp zu einem Atom pro Mol, weil das durch Lichtabsorptionsbestimmung ermittelte, durchschnittliche Molekulargewicht 965 betrug, woraus sich 0,93 Atome S pro Mol Porphyrin ergeben. Der Unterschied zwischen 0,93 und 1 liegt wohl innerhalb der Fehlermöglichkeiten der optischen Bestimmung, weil mit einem Durchschnittswert des Absorptionskoeffizienten gerechnet werden muß. Trotzdem halten wir es für wahrscheinlicher, daß auch die 3,08% S während der sechsstündigen Hydrolyse sekundär ins Porphyrinmolekül eingetreten sind. Demgemäß würde folgendes bei der Hydrolyse von natürlichem Porphyrin c stattfinden: Eine Bindung unbekannter Art zwischen Eiweiß und Porphyrinseitenketten wird zuerst aufgelöst, wobei Hämato- und Protoporphyrin entstehen. Inzwischen entsteht bei der Hydrolyse aus der Eiweißkomponente freies Cystein, daß sich dann mit Hämato- und Protoporphyrin in oben dargelegter Weise vereinigt. Wie schon früher betont wurde, bleiben während dieser Umwandlungen die beiden Hauptmerkmale von Porphyrin c, die Lage der Absorptionsbanden und die Unlöslichkeit in Äther, unbeeinflußt. Dies ist der Grund, daß das schwefelhaltige, nach Hydrolyse erhaltene Porphyrin c, als aus dem Cytochrom c direkt herstammend betrachtet wurde.

Wenn also die Vorstellung über die Bildung von Cytochrom c durch Kondensation von SH-Gruppen mit den Vinylgruppen des Protohämins nicht zutrifft, so müssen irgendwelche andere Gruppen *an denselben Seitenketten* des Porphyrins angelagert sein. Es kommen entweder Stickstoff oder Sauerstoff in Frage. *Zeile* (12) hat solche Kondensationsprodukte zwischen stickstoffhaltigen Gruppen und Porphyrin-Vinyl untersucht. Er fand, daß ein Kondensat mit Glykokoll zwar in bezug auf Spektrum und Löslichkeit mit dem natürlichen Porphyrin C übereinstimmt, dagegen mit HBr-Eisessig nicht spaltbar ist. *Zeile* stellte auch eine Reihe von anderen, entsprechend gebauten Verbindungen zwischen Porphyrin und verschiedenen Stickstoffbasen

dar, wie NH_3, Dimethylamin, Piperidin, dann auch solche mit tertiärem N-Atom wie Trimethylamin, Pyridin, Collidin und Chinolin. Von diesen Produkten wiesen die Pyridin-, Collidin- und Chinolinkondensate die



Spaltbarkeit mit HBr-Eisessig auf. *Zeile* zog daraus die Schlußfolgerung, daß auch im Cytochrom C eine tertiäre N-Base mit einer oder beiden Seitenketten (2- und 4-) des Porphyrins verbunden wäre.

Seitdem gefunden wurde (2, 3), daß die Kondensation von Porphyrin mit Cystein unter Vermittlung der SH-Gruppe ein „c-Porphyrin" gibt, das die typischen Eigenschaften des natürlichen Porphyrins c in bezug auf Ätherunlöslichkeit, Spektrum und Spaltbarkeit mit HBr-Eisessig gibt, lag eigentlich kein Grund vor anzunehmen, daß im Cytochrom c gerade eine tertiäre N-Base mit dem Porphyrin kondensiert wäre.

Trotzdem wurde zur weiteren Klärung der Frage der folgende Versuch angestellt. Es standen nach den Arbeiten des Verfassers über Porphyrin c gesammelte Hydrolysate, von etwa 250 g reinem Cytochrom c herstammend, zur Verfügung, aus welchen das Porphyrin c durch Zusatz von Lauge ausgeflockt war. Die an NaCl reichen Mutterlaugen wurden im Vakuum eingedampft, ausgeschiedenes Kochsalz abgetrennt, weiter eingedampft usw., bis 6 Liter gelbbraune Lösung übrig war. Jetzt wurde mit Soda stark alkalisch gemacht und wiederholt mit 600 ccm Amylalkohol extrahiert. Die vereinigten Auszüge wurden im Vakuum stark eingedampft, dann Amylalkohol und 1%ige Sodalösung zugegeben und im Scheidetrichter geschüttelt. Die abgetrennte amylalkoholische Schicht wurde noch einmal mit wenig Sodalösung gewaschen und im Vakuum eingedampft. Der braune, schmierige Rückstand wog nur 0,2 g, d. h. 0,08% vom angewandten Cytochrom c. Hätte das Cytochrom c eine tertiäre N-Base enthalten, so müßte man sie wahrscheinlich bei dieser Behandlung im alkalischen Amylalkoholextrakt wiedergefunden haben, jedenfalls wenn sie nicht flüchtig wäre. Nehmen wir an, daß jedes Molekül Cytochrom c ein Molekül N-Base vom Mol.-Gew. = 82 enthielte, so müßte ein Rückstand von 0,5% statt 0,08% gefunden werden. Dieser Versuch gibt also keinen Anhaltspunkt für die Richtigkeit der *Zeile*schen Auffassung.

Zusammenfassend muß also gesagt werden, daß keine genügenden Gründe vorliegen, um Stickstoff oder Schwefel als Bindeglied zwischen

Hämin und Protein im Cytochrom C anzunehmen. Es bleibt also noch der *Sauerstoff* zu berücksichtigen. Bei der großen Reaktionsfähigkeit der Vinyl- und Oxyäthylgruppen erscheint es keineswegs ausgeschlossen, daß eine Kondensation zwischen einer Hydroxylgruppe und den reaktiven Seitenketten des Porphyrins stattfinden könnte. Da die Addition einer tertiären N-Gruppe oder einer SH-Gruppe die gleichen, charakteristischen „Porphyrin c"-Eigenschaften hervorruft, so wäre zu erwarten, daß die Addition einer Substanz R·OH wieder die gleichen Eigenschaften erscheinen ließe. Darüber müssen künftige Versuche entscheiden. Es sei hier nur angedeutet, daß man in diesem Zusammenhang auch an *Zucker* denken muß, denn das reine Cytochrom C enthält Zucker in hinreichenden Mengen (6). Über Kondensate zwischen Zucker und den labilen Seitenketten von Proto- bzw. Hämatoporphyrin scheint bisher nichts bekannt zu sein.

Es sei zur Abgrenzung der c-Porphyrine gegen ähnliche Substanzen an die folgenden Tatsachen erinnert. *Keilins* (13) Meinung, daß das Cytochrom c durch abwechselnde Oxydation und Reduktion in der Zelle entstehe, wird nicht zutreffen. Zwar konnte *Zeile* (12) die von *Keilin* beobachtete Verschiebung der Spektra von Protohämochromogenen bis zur Ähnlichkeit mit Cytochrom c bei wiederholter Oxydation und Reduktion bestätigen, aber dasselbe trat bei gleicher Behandlung von *Meso*häminderivaten ein. Hier müssen also Reaktionen stattfinden, die mit der Bildung von Cytochrom c nichts gemeinsam haben.

Haurowitz (14) erhielt bei der tryptischen Verdauung von Hämoglobin Produkte, die außer Hämin noch Aminosäuren und etwas Schwefel enthielten. Diese „Häminproteosen" haben mit den „c-Häminen" nichts zu tun, weil in den Häminproteosen die Aminosäuren mit den Propionsäureresten des Hämins peptidartig verknüpft sind. *Zeile* und *Piutti* (15) haben derartige Porphyrin-Glykokollverbindungen dargestellt und gefunden, daß sie weder das typische Spektrum, noch die Spaltbarkeit mit HBr-Eisessig der „c"-Verbindungen zeigen.

Barkan und *Schales* (16) fanden, daß bei peptischer Verdauung von Blut wasserlösliche Hämine entstehen, die jedoch gegen HBr-Eisessig resistent waren; nach meiner Meinung sollten sie also nicht als „c-Hämine" bezeichnet werden. Wahrscheinlich lagen hier Hämin-Aminosäureverbindungen von ähnlichem Bau wie *Haurowitz'* Häminproteosen vor.

Zum Schluß sei darauf hingewiesen, daß die in dieser Arbeit nachgewiesene Kopplung zwischen den Vinyl-Seitenketten des Protoporphyrins und Cysteins bei saurer Hydrolyse einige früher schwerverständliche Ergebnisse erklärt. *Haurowitz* fand im sauren Hydrolysat des Hämoglobins nur sehr wenig Cystein oder Cystin. Wurde das

Hämin *vor der Hydrolyse* entfernt, so wurde im Hydrolysat jetzt reichlich Cystin bzw. Cystein gefunden (17). Dieses Ergebnis ist nach meinen oben angeführten Befunden ohne weiteres verständlich. *Keilin* und *Hartree* fanden nach saurer Hydrolyse von Cytochrom c nur 1,1% Cystin im entfärbten Hydrolysat. Diese Zahl ist offenbar aus demselben Grunde zu niedrig (18).

Literatur.

1) *H. Theorell*, Enzymologia **4**, 102, 1937. — 2) *Derselbe*, diese Zeitschr. **298**, 242, 1938. — 3) *Derselbe*, Enzymologia VI, 88, 1939. — 4) *H. Fischer* u. *B. Pützer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **154**, 53, 1926. — 5) *Dieselben*, ebenda **154**, 52, 1926. — 6) *H. Theorell*, diese Zeitschr. **285**, 207, 1936. — 7) *K. Zeile* u. *F. Reuter*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **221**, 101, 1933. — 8) *B. Holmberg*, K. Svenska Vetenskapsakademiens Ark. f. Kemi, mineralogi och geologi 12 A, No. 11, 1036, (deutsch). — 9) *Derselbe*, ebenda 12 A, No. 14, 1937 (deutsch); s. auch 12 B, No. 47, sowie J. f. prakt. Chem. **141**, 93, 1934. — 10) *O. Schumm*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **168**, 1, 1927. — 11) *K. A. H. Mörner*, ebenda **42**, 349, 1904. — 12) *K. Zeile*, ebenda **207**, 35, 1932. — 13) *D. Keilin*, Société de Biologie, 27. u. 28. Mai 1927, S. 16. — 14) *F. Haurowitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **188**, 161, 1930. — 15) *K. Zeile* u. *P. Piutti*, ebenda **218**, 52, 1933. — 16) *G. Barkan* u. *O. Schales*, ebenda **246**, 181, 1937. — 17) *F. Haurowitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **232**, 153, 1935. — 18) *D. Keilin* u. *E. F. Hartree*, Proc. Roy. Soc. London (B) **122**, 298, 1937.

Veränderungen der enzymatischen Hydrolyse von Stärke im Reis während der Lagerung.

Von

A. Sreenivasan.

(Aus der biochemischen Abteilung des Indischen wissenschaftlichen Instituts Bangalore.)

(Eingegangen am 20. Februar 1939.)

Die hervorstechendste Eigenschaft von frisch geerntetem Reis ist sein ungenügendes Quellvermögen beim Kochen mit Wasser. Neuer, ungelagerter Reis verkocht schnell zu breiiger Konsistenz. Wenn man Reis lagert, kocht er besser und entwickelt eine größere Wasseraufnahmefähigkeit. Der Grund zu diesem unterschiedlichen Verhalten beim Kochen zwischen frischem und abgelagertem Reis ist noch nicht befriedigend geklärt. Es wurde behauptet, daß eine fortschreitende Veränderung der Stärke vom Sol- zum Gelzustand vorläge und daß diese Änderung dem Reis sowohl Starrheit als Porosität verleihe (*Rao*, 1935). Auch wurde dargetan, daß während der Lagerung ein Aufweiten gewisser Kapillaren im Korn stattfinde, was eine größere Wasseraufnahme während des Kochens zulasse (*Subbaramiah* und *Rao*, 1937).

Bekannt ist auch, daß der Genuß von ungelagertem Reis Verdauungsbeschwerden verursacht (*Sreenivasan* und *Subrahmanyan*, 1935); es konnte gezeigt werden, daß die Verdaulichkeit der Reisstärke in vitro durch Salzsäure, Takadiastase oder Pankreasamylase mit der Lagerung zunimmt (*Sahasrabuddhe* und *Kibe*, 1935). Neuerdings wurde durch den Verfasser (*Sreenivasan*, 1939) gezeigt, daß die aus frisch geernteten Reissorten gewonnenen Stärken durch Amylasen in stärkerem Ausmaß gespalten werden als die aus abgelagerten Reissorten stammenden; der Unterschied, wenn auch gering, ist doch einwandfrei vorhanden.

Über die genaue Natur der Veränderungen, die in dem Korn während der Lagerung vor sich gehen, weiß man aber noch sehr wenig. Da die Kohlenhydrate den wesentlichen Bestandteil des Korns ausmachen und da das Quellen beim Kochen hauptsächlich eine Eigenschaft der Stärke im Korn ist, haben wir geprüft, ob die Lagerungsveränderungen im Reis von Umwandlungen im Charakter und Verhalten der Stärke begleitet sind.

Die vorliegende Arbeit behandelt die Lagerungsveränderungen in bezug auf 1. das Quellvermögen des Korns beim Kochen, 2. die amylo-

lytische Aktivität der Körner, 3. den Stärkeabbau durch verschiedene Amylasen und 4. die Größe der Stärkeverflüssigung bei verschiedenen Temperaturen.

Experimenteller Teil.

Für die Versuche wurden drei verschiedene Reissorten (mit *H*, *K* und *T* bezeichnet) verwandt. Es handelte sich um reine Rassen, die ich durch die Liebenswürdigkeit des Leiters der „Hebbal Agricultural Farm", Mysore, unmittelbar nach der Ernte im Juni 1937 erhielt.

I. Wasseraufnahmevermögen beim Kochen.

Die Quellfähigkeit der drei Reissorten beim Kochen wurde vom Zeitpunkt der Ernte an über 3 Monate lang von Zeit zu Zeit geprüft. Die Proben wurden in ungeschältem Zustand in weithalsigen Flaschen aufbewahrt, die nur leicht mit Wattestopfen verschlossen waren. Die Volumenzunahme beim Kochen wurde in jedem Falle durch Verdrängung eines bekannten Wasservolumens mit einer bestimmten Gewichtsmenge (gewöhnlich 10 g) von geschälten *ganzen* Körnern sowohl vor als auch nach dem Kochen unter festgelegten und vergleichbaren Bedingungen bestimmt. Die Messungen wurden in einem besonders verbesserten Dilatometer ausgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I. Veränderungen der Quellfähigkeit beim Kochen während der Lagerung.

Sorte	Erntedatum	Volumen des ungekochten Reises	Datum der Probe					
			24. VI. 1937	6. VII. 1937	21. VII. 1937	18. VIII. 1937	1. IX. 1937	15. X. 1937
	1937	ccm	Volumen des gekochten Reises in ccm					
H	12. VI.	10,3	24,7	29,9	34,1	35,0	35,0	35,1
K	8. VI.	10,7	27,8	34,2	38,5	41,7	43,9	43,8
T	16. VI.	10,4	20,8	31,2	40,4	42,6	43,7	43,6

Die Ergebnisse zeigen, daß die Wasseraufnahme durch gekochten Reis mit der Lagerdauer wächst, bis sie nach ungefähr 3 oder 4 Monaten ein Maximum erreicht. Die einzelnen gekochten Körner von gelagerten Proben nehmen an Größe zu und bleiben getrennt. Frischer Reis nimmt beim Kochen kaum zweimal sein Volumen an Wasser auf, während das abgelagerte Korn zu ungefähr dem Vierfachen seines ursprünglichen Volumens aufquillt.

II. Amylolytische Aktivität.

Die Aktivität der beiden Amylasen des Kornes wurde für die drei Sorten zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Methoden zur Extraktion und Bestimmung der zuckerbildenden β-Amylase und der dextrinbildenden α-Amylase waren mit den in einer früheren Veröffentlichung (*Giri* und *Sreenivasan*, 1937) beschriebenen identisch.

Tabelle II zeigt die Veränderungen in der Aktivität der β- und α-Amylase während der Lagerung.

Tabelle II.

Veränderungen der Amylasewirksamkeit während der Lagerung.

a) β-Amylase.

Sorte	Hydrolysendauer Std.	Datum der Probe: 24. VI.	6. VII.	21. VII.	18. VIII.	1. IX.
		Wirksamkeit in mg Maltose, bezogen auf das Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches				
H	1	11	9	7	5	4
	3	39	19	10	12	9
	24	93	74	55	45	34
K	1	11	8	4	9	0
	3	39	30	15	12	9
	24	74	95	75	66	34
T	1	10	5	0	4	0
	3	30	16	9	10	5
	24	77	68	42	39	26

b) α-Amylase.

Zeit	Datum der Probe: 24. VI.			6. VII.			21. VII.			18. VIII.			1. IX.		
	Sorte														
	H	*K*	*T*	*H*	*K*	*T*	*H*	*K*	*T*	*H*	*K*	*T*	*H*	*K*	*T*
Min.	Färbung mit n/200 Jodlösung														
15	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
30	BV	BV	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
45	BV	BV	BV	BV	B	B	BV	B	B	—	—	—	—	—	—
60	—	—	—	BV	BV	VB	BV	BV	B	BV	B	B	—	—	—
90	—	—	—	—	—	—	BV	BV	BV	—	—	—	BV	B	B
120	V	BV	BV	—	—	—	—	—	—	BV	BV	B	BV	B	B

B = Blau; BV = Blau-Violett; V = Violett.

Es ergibt sich, daß die Aktivität der beiden Amylasen mit der Lagerdauer abnimmt, bis sie nach ungefähr 3 Monaten fast inaktiv werden. Daß die Enzyme noch weiter im Korn anwesend bleiben und nur vom aktiven zu einem latenten Zustand während der Lagerung übergehen (*Giri* und *Sreenivasan*, 1936), ist aus den Ergebnissen der Tabelle III ersichtlich, in der die Aktivitäten der Phosphatpufferextrakte ($p_H = 7{,}0$) von frisch geernteten und 3 Monate gelagerten Körnern angegeben sind.

Die verzuckernden und verflüssigenden Enzyme werden also durch Extraktion mittels Phosphatpufferlösung bei p_H 7,0 in einem fast völlig aktiven Zustand erhalten.

Tabelle III.

Amylasenwirksamkeit in Phosphatpufferlösungen (p_H 7,0).

a) β-Amylase.

Sorte	Hydrolysendauer Std.	Frisch geernteter Reis Wirksamkeit in mg Maltose	3 Monate alter Reis Wirksamkeit in mg Maltose	Sorte	Hydrolysendauer Std.	Frisch geernteter Reis Wirksamkeit in mg Maltose	3 Monate alter Reis Wirksamkeit in mg Maltose
H	1	26	24	*T*	1	18	20
	3	57	50		3	76	67
	24	314	306		24	309	300
K	1	19	14				
	3	49	57				
	24	287	290				

b) α-Amylase.

Dauer	Frisch geernteter Reis			3 Monate alter Reis		
	Sorte					
	H	*K*	*T*	*H*	*K*	*T*
Min.	Färbung mit Jodlösung					
15	BV	B	B	B	B	B
30	BV	BV	BV	BV	BV	B
60	V	V	BV	BV	BV	B
90	V	V	V	BV	BV	BV
120	—	—	—	V	BV	BV
360	—	—	—	V	V	BV

B = Blau; BV = Blau-Violett; V = Violett.

III. Verzuckerungsgrenzen.

Ein Studium des Stärkeabbaus durch verschiedene Amylasen ist von Wichtigkeit, um gewisse Konstitutionseigenheiten aufzuklären, welche durch rein chemische Mittel nicht immer zugänglich sind (*Hanes*, 1937). Die Grenzspaltung der Stärke durch verschiedene Amylasentypen ist von einer großen Anzahl von Forschern studiert worden (*Giri*, 1938); die folgenden Experimente beziehen sich auf ihre Änderungen während der Lagerung des Reiskorns. Die angewandten Enzyme, ihre Konzentrationen und das p_H, bei welchem die betreffenden Reaktionen durchgeführt wurden, sind nachfolgend angegeben.

Enzymmaterial	Konzentration	Reaktions-p_H
Ungekeimtes Reiskorn, Extrakt	20 %	4,6 m/5 Essigsäure-Acetatpuffer
Gekeimtes „ „	20 %	4,6 „
Taka-Diastase (*Parke Davis*) ..	0,1 %	4,6 „
Gereinigte Amylase der „Süßen Kartoffel“ * (Ipomea batatas)	0,1 %	6,0 „
Menschlicher Speichel	Verd. 1 : 5	6,8 m/15 Phosphatpuffer

* Hergestellt nach *Giri* (1934).

Das Reaktionsgemisch bestand aus 50 ccm einer 3%igen verkleisterten Reismehlsuspension, 20 ccm Acetat- oder Phosphatpuffer von geeignetem p_H, 10 ccm Enzymlösung und 20 ccm Wasser. Dem Gemisch wurden einige Tropfen Toluol zugesetzt und die Hydrolyse im Thermostaten bei 35 ± 0,1° C durchgeführt; nach 48 Stunden wurden 20 ccm des Reaktionsgemisches entnommen und die Verzuckerung nach *Willstätter-Schudel* (1918) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV als mg Maltose, bezogen auf das Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches, ausgedrückt. Die Ergebnisse der Kontrollversuche für die Reduktionskraft der Enzymlösungen und der Substrate wurden in Abzug gebracht. Die Wirksamkeit der Enzymlösungen wurde durch Aufbewahrung im Kühlschrank nahezu konstant gehalten und bei jeder Probennahme gegen eine 2,25%ige Lösung von *Zulkowskys* löslicher Stärke geprüft.

Tabelle IV. Veränderungen während der Lagerung in der Verzuckerungsgrenze von Reisstärke durch verschiedene Amylasen.

Sorte	Datum der Probe: 24. VI.	6. VII.	21. VII.	18. VIII.	1. IX.
	Maltose in mg				
	1. Extrakt aus ungekeimtem Reiskorn.				
H	26	77	128	154	235
K	85	100	117	190	—
T	98	91	123	178	290
Stärkelösung	105	124	102	120	102
	2. Extrakt aus gekeimtem Reiskorn.				
H	194	217	225	271	269
K	223	265	286	285	—
T	228	263	275	286	272
Stärkelösung	260	262	272	255	260
	3. Takadiastase.				
H	245	355	397	420	405
K	168	370	430	445	—
T	334	375	430	460	449
Stärkelösung	343	360	340	368	370
	4. Süße Kartoffel- (Speichel-) Amylase.				
H	367	518	610	600	636
K	315	480	520	558	—
T	377	544	554	563	616
Stärkelösung	550	585	567	—	579
	5. Speichelamylase.				
H	158	315	360	407	426
K	103	328	335	385	—
T	155	374	389	385	365
Stärkelösung	319	—	304	305	385

Aus Tabelle IV ergibt sich, daß unabhängig von der Natur der Amylase und der Reisart eine fortschreitende Zunahme des Verzuckerungsgrades der Stärke im Reis mit der Lagerdauer erfolgt.

Diese Zunahme ist größer während der ersten Tage nach der Ernte. Die Unterschiede werden mit der Lagerung geringer und bei den letzten Versuchsstadien sind sie praktisch zu vernachlässigen.

IV. Fraktionierte Verflüssigung.

Die Veränderungen der Verflüssigung von Reisstärke bei verschiedenen Temperaturen während der Lagerung wurden nach der Methode von *Warth* und *Darabsett* (1914) studiert. Ein halbes Gramm feines Reispulver wurde mit 10 ccm Wasser angerührt und 1 Stunde lang unter regelmäßigem Rühren auf bestimmter Temperatur erhalten. Die gesamte bei dieser Temperatur lösliche Stärke wird dabei in Kleister verwandelt, in welchem die unveränderten Stärkekörner, die eine höhere Verflüssigungstemperatur benötigen, suspendiert bleiben. Das Gemisch wurde abgekühlt, mit 10 ccm Acetatpuffer von p_H 6,0 und 2 ccm einer 0,1 %igen Lösung der Amylase aus Ipomea batatas (*Giri*, a. a. O.) versetzt und die Hydrolyse bei 35° C im Thermostaten durchgeführt. Die im Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches nach 24 Stunden gebildeten reduzierenden Zucker wurden wie oben bestimmt.

Außer den drei Reisarten wurde auch eine Probe reiner Reisstärke (B. D. H.) für die Versuche verwendet, um eine etwaige Änderung der Konzentration der Enzymlösung festzustellen.

Aus den in Tabelle V wiedergegebenen Ergebnissen ist zu ersehen, daß die Kontrollwerte für die ungelatinierte Stärke mit der Lagerdauer

Tabelle V. Veränderungen während der Lagerung in der Verflüssigung von Stärke bei verschiedenen Temperaturen.

Sorte	Datum der Probe	Kontrolle (unverkleistert)	Verflüssigungstemperatur 50°	60°	70°	80°	100°
		Maltose in mg					
H	24. VI.	34	47	66	92	154	156
	6. VII.	69	98	129	134	157	161
	21. VII.	84	100	136	134	158	159
	18. VIII.	91	103	137	139	151	147
	1. IX.	114	120	—	136	142	164
K	24. VI.	28	54	72	104	142	168
	6. VII.	49	88	104	146	162	166
	21. VII.	96	108	119	139	146	168
	18. VIII.	104	120	125	131	163	154
	1. IX.	120	117	—	134	160	151
T	24. VI.	37	92	112	124	146	148
	6. VII.	87	94	119	110	154	152
	21. VII.	96	90	125	129	151	156
	18. VIII.	108	120	142	134	138	146
	1. IX.	110	126	—	138	158	156
Reisstärke (Kontrolle)	24. VI.	15	32	—	44	166	190
	6. VII.	21	36	—	59	185	217
	21. VII.	15	29	—	45	188	248
	18. VIII.	15	19	—	49	169	219
	1. IX.	19	29	—	52	188	226

wachsen. Daraus ist zu schließen, daß die Lagerung die Stärke im Korn verdaulicher macht. *Sahasrabuddhe* und *Kibe* (a. a. O.) haben berichtet, daß das ruhende Reiskorn ein aktives amylolytisches Enzym enthält, das sowohl ungequollene wie verkleisterte Stärke angreift und das bis zu gewissem Grade für die bessere Verdaulichkeit von gelagertem Reis im Vergleich zu frischen Reis verantwortlich ist.

Die Ergebnisse zeigen auch, daß für jede bestimmte Temperatur die Verflüssigung mit der Lagerungsdauer zunimmt; dieser Unterschied wird bei den höheren Verflüssigungstemperaturen geringer und zwischen 80 und 100° besteht praktisch kein Unterschied im Ausmaß der Verflüssigung und der Hydrolyse, weil offenbar die Verkleisterung bei ungefähr 80° vollständig ist. Die Verflüssigung steigt mit gesteigerter Temperatur, wobei diese Steigerung in den Anfangsstadien sehr hoch ist. Der Unterschied nimmt ebenfalls mit der Lagerung ab.

Interessant ist die Feststellung, daß bei reiner Reisstärke bei tieferen Temperaturen nur ein sehr geringer Teil verkleistert, bis hinauf zu 70 oder 80° C, wo dann die ganze Stärke verflüssigt wird. In dieser Hinsicht besteht daher ein großer Unterschied in den Ergebnissen mit reiner Reisstärke und den mit dem Korn erhaltenen.

V. Besprechung.

Die zwei wichtigen Veränderungen, welche die Lagerung von Reis begleiten, sind

1. gesteigertes Quellvermögen beim Kochen (Tabelle I) und
2. leichtere Verdaulichkeit der Stärke (Tabellen IV und V).

Die Faktoren, welche zur größeren Wasseraufnahme beim Kochen beitragen, sind nicht genau bekannt; auch ist nichts bekannt in bezug auf die Natur der Veränderungen in den Stärkekomponenten des Korns während der Lagerung nach der Ernte. Die Tatsache, daß die Stärke von abgelagertem Reis eine größere Verflüssigung erleidet (Tabelle V), läßt darauf schließen, daß sie durch die Verdauungsfermente des menschlichen Organismus leichter angegriffen wird als die Stärke von frisch geerntetem Reis. Es ist auch möglich, daß gekochter, ungelagerter Reis dem Angriff der Fermente eine geringere Reaktionsoberfläche bietet, da er klumpig ist und von dem anhaftenden Schleim zusammengehalten wird. Es ist gezeigt worden, daß der Grad des Eindringens gewisser Schimmelpilze in Reis, der verschieden stark gekocht war, hauptsächlich von dem Zustand des Kochproduktes bestimmt wird (*Reddi* und *Subrahmanyan*, 1937).

Es ist bezeichnend, daß im Reiskorn unmittelbar nach der Ernte ein Enzym (α-Amylase) vorhanden ist, das fähig ist Stärke zu ver-

flüssigen, und daß dieses Enzym während der Lagerung latent und inaktiv wird. Diese Amylase mag bis zu gewissem Grade dafür verantwortlich sein, daß ungelagerter Reis zu einem Kleister verkocht. Das Enzym ist ziemlich hitzebeständig (*Yamagishi*, 1937) und kann während des Kochprozesses des Kornes auf die Stärke einwirken und diese partiell in Dextrin verwandeln. Wenn frisch geernteter Reis 2 bis 3 Stunden lang bei 60° trocken erhitzt und dann gekocht wird, so ist seine Quellfähigkeit bedeutend verbessert (*Sreenivasan*, 1939), was wahrscheinlich auf die Inaktivierung der α-Amylase zurückzuführen ist. Aufkochen ist eine anerkannte Methode, um frisch geernteten Reis für sofortigen Gebrauch geeignet zu machen. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß der Prozeß des Erhitzens oder Dämpfens während des Aufkochens ebenfalls das Enzym inaktiviert. Hohe Temperaturen und verringerte Luftzufuhr sind zwei wichtige Faktoren, welche die Lagerungsveränderungen im Reis beschleunigen. Ihr Einfluß ist nicht geklärt.

Nach *Samec* und *Mayer* (1921) kann Stärke in Lösung durch Elektrodialyse in Amyloamylose (blaue Jodreaktion) und Erythroamylose (rote Jodreaktion) gespalten werden. *Samec* und *Waldschmidt-Leitz* (1931) haben ferner die Hydrolyse dieser Komponenten durch verschiedene Amylasen untersucht und gezeigt, daß Amyloamylose leicht und vollständig sowohl durch α- als durch β-Amylase hydrolysiert wird, während die Erythroamylose nur schwierig zu hydrolysieren ist. Es ist möglich, daß die Steigerung der Verzuckerung der Reisstärke durch verschiedene Amylasen während der Lagerung (Tabelle IV) auf Veränderungen in dem Verhältnis der zwei Stärkekomponenten zueinander zurückzuführen ist. Zweifellos kann ein weiterer Einblick in diese Verhältnisse vom Studium der Veränderungen der Stärkekomponenten des Korns während der Lagerung gewonnen werden.

Zusammenfassung.

Die Lagerung von Reis nach der Ernte wird begleitet von

1. einer Steigerung der Quellfähigkeit des Korns beim Kochen,

2. einer Aktivitätsabnahme der α- und β-Amylasen des Keimlings,

3. einer Steigerung des Verzuckerungsgrades der Stärke des Korns durch verschiedene Amylasen,

4. einer Steigerung der Stärkeverflüssigung bei einer bestimmten Temperatur.

Die Beziehung dieser Ergebnisse zu

a) der leichteren Verdaulichkeit von abgelagertem Reis im Vergleich zu frisch geerntetem Reis und

b) den möglichen Veränderungen in den Eigenschaften der Stärke im Korn während der Lagerung
wurden diskutiert.

Ich danke Herrn Prof. *Subrahmanyan*, in dessen Laboratorium diese Arbeit ausgeführt wurde, sowie Herrn Dr. *K. Venkata Criri* für seine freundliche Hilfe bei diesen Untersuchungen.

Literatur.

Giri, J. Ind. Chem. Soc. **11**, 339, 1934; **15**, 249, 1938; *Giri* u. *Sreenivasan*, Nature **138**, 406, 1936; diese Zeitschr. **289**, 155, 1937. — *Hanes*, New Phytol. **36**, 101, 189, 1937. — *Rao*, Symposium on Colloids, Indian Academy of Sciences, December, Bombay. — *Reddi* u. *Subrahmanyan*, Trans., Nat. Inst. Sci., India **1**, Nr. 11, 1937. — *Sahasrabuddhe* u. *Kibe*, Ind. J. Agric. Sci. **5**, 1, 1935. — *Samec* u. *Mayer*, Kolloidchem. Beih. **31**, 272, 1921. — *Samec* u. *Waldschmidt-Leitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **203**, 16, 1931. — *Sreenivasan*, Ind. J. Agric. Sci. **9**, under publn. 1939. — *Sreenivasan* u. *Subrahmanyan*, Curr. Sci. **4**, 378, 1935. — *Subbaramiah* u. *Rao*, Proc. Ind. Acad. Sci. **6** B, 36, 1937. — *Warth* u. *Darabsett*, Memoirs, Dept. Agric., India, Chem. Ser. **3**, Nr. 5, 1914. — *Willstätter* u. *Schudel*, Ber. **51**, 780, 1918. — *Yamagishi*, J. Agric. Chem. Soc. (Japan) **13**, 1268, 1284, 1937.

Über die Durchlässigkeit der Zellmembran für Blausäure.

Von

Wolfgang Heubner und **Emma Schreiber.**

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 2. Mai 1939.)

Ein von *Otto Schmidt*[1] geschriebener Satz hatte den Wortlaut: „Auch das CN-Radikal vermag die Zellmembran nicht zu durchdringen": dazu hatten *Havemann* und *Heubner*[2] ablehnend Stellung genommen und bemerkt, daß diese Behauptung „wohl kaum zu begründen und erst recht nicht zutreffend" sei. Gegen diese Ablehnung wehrte sich *Schmidt*[3] unter Hinweis auf frühere Untersuchungen[4], in denen er in den Leichen blausäurevergifteter Menschen und Tiere nur im hämolytischen Serum, dagegen nicht in den Blutzellen „Cyanhämoglobin" fand, ebenso in vitro immer erst nach Eintritt der Hämolyse diese Verbindung feststellen konnte.

Zu dieser Argumentation sei folgendes bemerkt: Wie lange bekannt ist[5], reagiert ausschließlich *Methämoglobin* mit Blausäure, nicht Oxyhämoglobin mit zweiwertigem Eisen; konnte doch in neuerer Zeit sogar eine sehr gute Methode zur Bestimmung von Methämoglobin bei Gegenwart von reichlich Oxyhämoglobin auf Grund dieser Tatsache entwickelt werden[6]: Wir bevorzugen daher auch von Cyan*meth*ämoglobin zu sprechen. Auch *Schmidt* berücksichtigte in seiner zuerst angezogenen Arbeit die erwähnte Tatsache, indem er (S. 260) zur Darstellung von „Cyanhämoglobin" von Methämoglobin ausging und „Cyanhämoglobin" ausdrücklich als Methämoglobinverbindung bezeichnete. Um so weniger verständlich scheint es uns, daß er vorher und nachher die Versuche am Tier oder an gewöhnlichen Blutkörperchen für stichhaltig ansah und ansieht, um daraus einen Schluß auf die Passage von Blausäure durch Zellmembranen zu ziehen. Die offensichtlichen Alterungserscheinungen an seinen Blutarten in vitro wie in der Leiche, von denen er ausschließlich die Hämolyse berücksichtigt, dürften ebensogut eine partielle Bildung von Methämoglobin umfaßt haben, und *darauf* möchten

[1] Diese Zeitschr. **296**, 227, 1938. — [2] Ebenda **299**, 228, 1938. — [3] Ebenda **299**, 376, 1938. — [4] Zeitschr. f. gerichtl. Med. **27**, 219, 1936. — [5] Vgl. z. B. *Haurowitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **137**, 68, 89, 1924; *Peters* u. *van Slyke*, Quantitative clinical chemistry **1**, 522, London 1931. [6] *Evelyn* u. *Malloy*, J. of biol. Chem. **126**, 1655, 1938; *Havemann, Jung* und *v. Issekutz*, diese Zeitschr. **301**, 116, 1939.

wir die erst dann zu bemerkende Entstehung von Cyanmethämoglobin zurückführen.

Übrigens sprechen wir lieber von Blausäure als von „Cyan-Radikal", da wir glauben, daß bei neutraler Reaktion ganz überwiegend Blausäure vorhanden ist; außerdem ist „Radikal" nicht identisch mit „Ion".

Zur vollen Klärung der Frage haben wir einige Versuche ausgeführt, die unsere von vornherein vertretene Ansicht bestätigt haben. Wir nehmen an, daß *Schmidt* sie wiederholen und sich dann selbst von seinem Irrtum überzeugen wird.

Wenn man nämlich Blutkörperchen nimmt, deren Blutfarbstoff in Methämoglobin verwandelt ist, und in annähernd isotonischer und isohydrischer Lösung mit Blausäure zusammenbringt, so wandelt sich augenblicklich — d. h. beim erstmaligen Umschütteln — *ohne jede Hämolyse* im Innern der Blutkörperchen die braune Farbe des Methämoglobins in die rote des Cyanmethämoglobins um. Dies zeigt also, daß Blausäure sehr schnell in Blutkörperchen eindringen, somit „Zellmembranen durchdringen" kann.

Ein solcher Versuch sei genauer beschrieben: Blut vom Hammel wurde mit einer Lösung von 0,6% Natriumnitrit und 0,4% Natriumchlorid versetzt, die braunen Blutkörperchen auf der Zentrifuge abgetrennt und noch zweimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen; mit dieser Lösung wurden sie dann auf das ursprüngliche Blutvolumen gebracht, so daß eine annähernd 50%ige Suspension entstand. Weiterhin wurde ein Gemisch aus 1 Teil 1%iger Cyankaliumlösung, 7 Teilen 0,9%iger Kochsalzlösung und 2 Teilen einer 0,15 mol. Lösung von Kaliumbiphosphat hergestellt; diese Lösung hatte bei Prüfung mit dem Universalindikatorpapier von *Merck* ein p_H von etwa 7. Wurde sie zu gleichen Teilen dem Blutkörperchenbrei zugegeben, so schlug deren Farbe ohne Verzug von Braun in Rot um.

Wie wir uns überzeugen konnten, machen auch ziemlich beträchtliche Änderungen des p_H für diese Reaktion wenig aus. Wichtig ist natürlich für ein klares Ergebnis des Versuchs die Vermeidung solcher Bedingungen, unter denen Hämolyse eintritt.

Zusammenfassung.

Blausäure dringt äußerst leicht durch die Membran roter Blutkörperchen in deren Inneres.

Kurze Mitteilungen.

Proteinteil des kohlenhydrat-oxydierenden Ferments der Gärung.

Von

Otto Warburg und **Walter Christian.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 16. Mai 1939.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Wie wir vor 2 Jahren gefunden haben[1], ist die Vergärung von Kohlenhydrat eine Wasserstoffübertragung durch Pyridin, bei der das Kohlenhydrat durch Pyridin zur Stufe der Brenztraubensäure oxydiert, die Brenztraubensäure (oder der Acetaldehyd) durch Dihydropyridin

Abb. 1. Proteinteil des oxydierenden Ferments der Gärung.
Aus Ammonsulfat. Nicht umkristallisiert. Vergr. 55fach.

reduziert wird. Diese Wirkung des Pyridins findet nur dann statt, wenn das Pyridin in einem Nucleotid an spezifische Proteine gebunden ist. Es besteht also das *oxydierende* Gärungsferment aus einem spezifischen Protein und Pyridinnucleotid, das *reduzierende* Gärungsferment aus einem anderen spezifischen Protein und Dihydro-Pyridinnucleotid.

[1] *O. Warburg* u. *W. Christian*, diese Zeitschr. **286**, 81, 1936.

Den Proteinteil des reduzierenden Gärungsferments haben *E. Negelein* und *H. J. Wulff* 1937 isoliert[1] und kristallisiert. Der Proteinteil des oxydierenden Gärungsferments ist in der letzten Zeit von den Verfassern isoliert worden. Er kristallisiert aus Ammonsulfat in den hier abgebildeten Formen.

Mit Hilfe des reinen Proteins des oxydierenden Gärungsferments konnte untersucht werden, welche Form des Kohlenhydrats es ist, die bei der Gärung von Pyridin oxydiert wird. Nach einer Arbeit, die *C. V. Smythe* und *W. Gerischer* 1933 in diesem Institut ausgeführt haben[2], lag die Annahme nahe, daß die Reaktionsform des Kohlenhydrats die von *H. O. L. Fischer* und *E. Baer* dargestellte[3] 3-Glycerinaldehyd-Phosphorsäure sei, eine Vermutung, die *O. Meyerhof*, *H. v. Euler* und viele andere geäußert haben, die sich jedoch nicht als zutreffend erwiesen hat. Vielmehr ist die Reaktionsform des Kohlenhydrats nach einer Entdeckung von *E. Negelein* und *H. Brömel* die 1, 3-Glycerinaldehyd-Phosphorsäure[4]. Es sei bemerkt, daß auch die 1-Glycerinaldehyd-Phosphorsäure, allerdings etwa 5000mal langsamer, von dem Pyridin unseres Ferments oxydiert wird. Die 3-Glycerinaldehyd-Phosphorsäure jedoch wird gar nicht oxydiert.

[1] *E. Negelein* u. *H. J. Wulff*, diese Zeitschr. **289**, 436, 1937; **293**, 351, 1937. — [2] *C. V. Smythe* u. *W. Gerischer*, ebenda **260**, 414, 1933. — [3] *H. O. L. Fischer* u. *E. Baer*, Ber. **65**, 337, 1932. — [4] *E. Negelein* u. *H. Brömel*, diese Zeitschr. **301**, 135, 1939.

Phosphatatische Inaktivierung von pflanzlichen Viren.

Von

E. Pfankuch und **G. A. Kausche**.

(Aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 20. Mai 1939.)

Von *Bawden* und *Pirie* ist zuerst die sehr bedeutsame Tatsache festgestellt worden, daß die bisher untersuchten pflanzlichen Viren infolge eines Nucleinsäuregehalts phosphorhaltig sind und daß dieser Nucleinsäuregehalt keine zufällige Verunreinigung sein kann, sondern ein wesentlicher Bestandteil des Virusmoleküls sein muß. Seitdem lag es nahe, diese Nucleinsäure in Parallele zu setzen mit den ebenfalls phosphorhaltigen Wirkgruppen einiger Fermente, den Alloxazin-, Pyridin- usw.-Nucleotiden. Jeder Angriff auf das Virusmolekül, der sich spezifisch gegen die Esterphosphorsäure richtete, mußte also dann zu einer Inaktivierung des Virus führen, wenn der Nucleinsäure der Charakter einer Wirkgruppe zukam.

Ausgehend von dieser Überlegung haben wir weitgehend gereinigte Phosphatasepräparate aus Rüben und Kartoffeln, über die *K. Hagenguth* demnächst berichten wird, auf Tabakmosaik-Virus (TM.-Virus) und Kartoffel-X-Virus einwirken lassen. Bei allen bisher angestellten Versuchen und Wiederholungen haben sich nun zum Teil bedeutende Inaktivierungen der Viren ergeben. Zwei Beispiele mögen zunächst genügen.

Versuch 16. Dezember 1938. Ansatz: 2 ccm X-Virus (2 mg), 4 ccm Phosphatase (280 PE.), 2 ccm Citratpuffer (m/5, p_H 5,9), 0,2 ccm Kaliumcyanid (neutralisiert), m/3. Kontrollansatz ebenso, H_2O statt Phosphatase. Einwirkungsdauer 48 Stunden, dann verdünnt und verimpft auf Datura stram. Infektionserfolg + = positiv, − = negativ.

Verdünnung	H_2O	Phosphatase	Verdünnung	H_2O	Phosphatase
1: 50	+ +	− −	1: 1000	− −	− −
1:100	+ +	− −	1: 5000	− −	− −
1:500	+ +	− −	1:10000	− −	− −

Versuch 6. April 1939. Ansatz: 2 ccm TM.-Virus (7 mg), 4 ccm Phosphatase (840 PE., 290 PE./mg Protein), 2 ccm Citratpuffer (wie oben), 0,1 ccm Kaliumcyanid (wie oben). Kontrollansatz H_2O statt Phosphatase. Einwirkungsdauer 48 Stunden, dann verdünnt nach Tabelle und verimpft auf Datura stram., je fünf Pflanzen. Blatthälftenmethode, als fester Standard: Kontrollansatz verdünnt 1 : 1000. Eine Blatthälfte stets mit Standard beimpft, zweite Blatthälfte mit Kontrollansatz bzw. Phosphataseansatz. — Die Tabelle gibt die absolute Anzahl der Einzelherde und dieselben Werte relativ, bezogen auf Standard = 100.

Verdünnung	Kontrollansatz			Phosphataseansatz		
	Standard	Kontrolle	relativ	Standard	Phosphatase	relativ
1 : 1 000	266	272	**102**	304	164	**54**
1 : 5 000	306	120	**32**	308	34	**11**
1 : 10 000	221	41	**18**	235	25	**11**
1 : 50 000	273	11	**4**	250	3	**1**
	1066	444	**41**	1097	196	**18**

Die Virus- und Phosphataselösungen waren dialysiert, Leitfähigkeiten $k = 4 \cdot 10^{-4}$ und darunter, die Phosphatasen waren frei von Oxydasen (keine O_2-Aufnahme mit Ascorbinsäure + Brenzcatechin im Schüttelthermostaten), trotzdem erfolgte der Kaliumcyanidzusatz, um jede Oxydationsinaktivierung zu unterdrücken.

Der Nachweis des abgespaltenen Orthophosphats ist bisher noch nicht gelungen, da die in Frage kommenden P-Mengen sehr klein sind und vermutlich schon eine teilweise Abspaltung des Esterphosphats zu einer völligen Inaktivierung des Virusmoleküls führt. Trotzdem möchten wir an der Annahme einer phosphatatischen Inaktivierung festhalten, da wir uns davon überzeugt haben, daß sehr viel kleinere Phosphatasekonzentrationen als die hier angewandten imstande sind, aus komplexen Nucleinsäuren, wie Hefenucleinsäure, Phosphorsäure abzuspalten.